

Synthese und Funktionalisierung  
anorganischer Nanopartikel  
zur Wechselwirkung mit  
Bakterien und Zellen



# Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doktor der Naturwissenschaften  
- Dr. rer. nat. -

vorgelegt von  
Dipl.-Ing. (FH) Alexander Peetsch  
aus Gevelsberg

vorgelegt der Fakultät für Chemie  
der Universität Duisburg-Essen

UNIVERSITÄT  
DUISBURG  
ESSEN

*Offen im Denken*





Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum vom Januar 2010 bis Dezember 2012 unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. rer. nat. Matthias Epple am Institut für Anorganische Chemie der Universität Duisburg-Essen durchgeführt.

Tag der Disputation: 17.04.2013

Erstgutachter: Herr Prof. Dr. rer. nat. Matthias Epple

Zweitgutachterin: Frau Prof. Dr. rer. nat. Bettina Siebers

Vorsitzender: Herr PD Dr. rer. nat. Holger Somnitz

Essen, den 21. April 2013



**Meiner Familie**



# Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	XIII
Tabellenverzeichnis	XIX
Abkürzungsverzeichnis	XXI
Abstract	XXV
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2 Theoretischer Teil</b>	<b>5</b>
2.1 Calciumphosphat-Nanopartikel . . . . .	5
2.2 Verwendung von Silber als antimikrobiellem Wirkstoff . . . . .	8
2.3 Gold-Nanopartikel . . . . .	12
2.4 Stabilität von Nanopartikeln in wässriger Dispersion . . . . .	14
2.5 Polyelektrolyte zur Stabilisierung von Calciumphosphat-Nanopartikeln .	21
2.5.1 Carboxymethylcellulose . . . . .	21
2.5.2 Chondroitinsulfat . . . . .	22
2.6 Darstellung von Carbonsäureamiden in wässrigen Lösemitteln . . . . .	23
2.7 Differenzierung von humanen mesenchymalen Stammzellen . . . . .	25
<b>3 Materialien und Methoden</b>	<b>27</b>
3.1 Rasterelektronenmikroskopie . . . . .	27
3.2 Energie-dispersive Röntgenspektroskopie . . . . .	27
3.3 Transmissionselektronenmikroskopie . . . . .	28
3.4 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie . . . . .	28
3.5 Scheibenzentrifugation . . . . .	29
3.6 Agarose-Gelelektrophorese . . . . .	30
3.7 UV/Vis-Spektroskopie . . . . .	30
3.8 Gefriertrocknung . . . . .	31
3.9 Dynamische Lichtstreuung . . . . .	31

3.9.1	Größenbestimmung . . . . .	31
3.9.2	Zeta-Potentialmessungen . . . . .	34
3.10	Fluoreszenzspektroskopie . . . . .	35
3.11	Thermogravimetrische Analyse . . . . .	35
3.12	Fourier-Transformations-Infrarotspektroskopie . . . . .	35
3.13	Atomabsorptionsspektroskopie und Elementaranalytik . . . . .	36
3.14	Röntgen-Kleinwinkelstreuung . . . . .	37
3.15	Silberionenfreisetzung aus silberdotierten Calciumphosphat-Nanopartikeln in Reinstwasser . . . . .	37
3.16	Berechnung der Löslichkeit von Silberchlorid in biologischen Medien . . .	37
<b>4</b>	<b>Praktische Durchführung</b>	<b>41</b>
4.1	Synthese von Calciumphosphat-Nanopartikeln . . . . .	41
4.2	Darstellung von 6-Aminofluorescein-Carboxymethylcellulose . . . . .	43
4.3	Synthese von F-CMC-stabilisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln . . .	44
4.4	Synthese von Gold-Nanopartikeln . . . . .	45
4.4.1	Reduktion mit Natriumborhydrid . . . . .	45
4.4.2	Reduktion mit Citrat und Gerbsäure . . . . .	45
4.4.3	Stabilisierung durch das Polymer Polyvinylpyrrolidon . . . . .	46
4.4.4	Funktionalisierung durch Mercaptoethylamin . . . . .	47
4.4.5	Funktionalisierung durch ( <i>RS</i> )-Liponsäure . . . . .	48
4.4.6	Darstellung von IgG-Antikörper-Gold-Nanopartikel-Konjugaten .	49
4.5	Biologische Experimente . . . . .	50
4.5.1	Eukaryotische Zelllinien . . . . .	50
4.5.1.1	Humane mesenchymale Stammzellen . . . . .	50
4.5.1.2	Periphere mononukleäre Blutzellen . . . . .	52
4.5.1.3	MG-63 Osteosarkom-Zellen . . . . .	53
4.5.2	Bakterienstämme . . . . .	53
4.5.2.1	<i>Escherichia coli</i> . . . . .	54
4.5.2.2	<i>Staphylococcus aureus</i> . . . . .	54
<b>5</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion</b>	<b>55</b>
5.1	Silberdotierte Calciumphosphat-Nanopartikel . . . . .	55
5.2	6-Aminofluorescein-Carboxymethylcellulose . . . . .	76
5.3	F-CMC-stabilisierte Calciumphosphat-Nanopartikel . . . . .	79
5.4	Biologische Wirkung silberdotierter Calciumphosphat-Nanopartikel . . .	85

5.4.1	Biologische Wirkung gegenüber Bakterien . . . . .	85
5.4.2	Biologische Wirkung gegenüber hMSCs und PBMCs . . . . .	90
5.4.3	Vergleich der toxischen Konzentrationen gegenüber Bakterien, hMSCs und PBMCs . . . . .	95
5.5	Aktivität von Silberionen in biologischen Medien . . . . .	98
5.6	Endozytose von F-CMC-stabilisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln .	105
5.6.1	Humane osteosarkome Zelllinie MG-63 . . . . .	105
5.6.2	Humane mesenchymale Stammzellen . . . . .	106
5.7	Chondroitinsulfat-stabilisierte Calciumphosphat-Nanopartikel . . . . .	110
5.8	Biologische Wirkung CS-stabilsierter Calciumphosphat-Nanopartikel . .	120
5.9	Gold-Nanopartikel . . . . .	126
5.9.1	Gold-Nanopartikel durch Reduktion mit Natriumborhydrid . . . .	126
5.9.1.1	Funktionalisierung mit Mercaptoethylamin . . . . .	126
5.9.1.2	Funktionalisierung mit ( <i>RS</i> )-Liponsäure . . . . .	128
5.9.2	Gold-Nanopartikel durch Reduktion mit Citrat und Gerbsäure . .	132
5.9.2.1	Stabilisierung mit Polyvinylpyrrolidon . . . . .	136
5.9.2.2	Funktionalisierung mit Mercaptoethylamin . . . . .	142
5.9.2.3	Funktionalisierung mit ( <i>RS</i> )-Liponsäure . . . . .	146
5.10	Antikörper-Gold-Nanopartikel-Konjugate . . . . .	150
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick</b>	<b>157</b>
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>159</b>
<b>7</b>	<b>Anhang</b>	<b>189</b>





# Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1	Wissenschaftliche Publikationen pro Jahr zum Thema „nano“ . . . .	1
Abb. 2.1	Ternäres Phasendiagramm $\text{CaO-P}_2\text{O}_5\text{-H}_2\text{O}$ . . . . .	6
Abb. 2.2	Schematische Darstellung der Keimbildung und des Partikelwachstums als Funktion der Zeit. . . . .	7
Abb. 2.3	Schematische Darstellung eines Polyelektrolyt-stabilisierten Calciumphosphat-Nanopartikels. . . . .	8
Abb. 2.4	Schematische Darstellung zur Definition des Zetapotentials. . . . .	15
Abb. 2.5	Verlauf der Gibbs-Energie als Funktion des Abstandes zwischen zwei Nanopartikeln. . . . .	16
Abb. 2.6	Schematische Darstellung von Polyelektrolyt-stabilisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln. . . . .	18
Abb. 2.7	Schematische Darstellung des Abstandes zwischen Polymer-stabilisierten Nanopartikeln. . . . .	19
Abb. 2.8	Qualitative Darstellung der gesamten Gibbs-Energie. . . . .	20
Abb. 2.9	Struktur des Polyelektrolyten Natrium-Carboxymethylcellulose. . .	22
Abb. 2.10	Struktur von Chondroitin-4-sulfat. . . . .	23
Abb. 2.11	Reaktionsmechanismus der Carbonsäureamidbildung. . . . .	24
Abb. 2.12	Schematischer Verlauf der Differenzierung von humanen mesenchymalen Stammzellen. . . . .	25
Abb. 3.1	Der Streuvektor. . . . .	32
Abb. 4.1	Schematisches Fließbild des Rohrreaktors zur Fällung von Calciumphosphat-Nanopartikeln. . . . .	41
Abb. 4.2	Spritzenvorsatzfilter für die Sterilfiltration von Calciumphosphat-Nanopartikel-Dispersionen. . . . .	42
Abb. 4.3	Reaktionsmechanismus der Carbonsäureamidbildung. . . . .	43
Abb. 4.4	Struktur von Polyvinylpyrrolidon. . . . .	46
Abb. 4.5	Struktur von Mercaptoethylamin. . . . .	47
Abb. 4.6	Spezies in einer wässrigen Lösung von Mercaptoethylamin. . . . .	47

Abb. 4.7	Struktur von ( <i>RS</i> )-Liponsäure. . . . .	48
Abb. 4.8	Synthesestrategien von Antikörper-Gold-Nanopartikel-Konjugaten. .	49
Abb. 5.1	Einfluss der Trehalosekonzentration auf die kolloidchemischen Eigenschaften CMC-stabilsierter Calciumphosphat-Nanopartikel. .	58
Abb. 5.2	Größenverteilung (DLS) undotierter CMC-stabilsierter Calciumphosphat-Nanopartikel. . . . .	59
Abb. 5.3	Größenverteilung (DLS) silberdotierter CMC-stabilsierter Calciumphosphat-Nanopartikel. . . . .	60
Abb. 5.4	Größenverteilung (DLS) von undotierten und silberdotierten CMC-stabilisierten Calciumphosphat-Nanopartikel nach der Gefriertrocknung. . . . .	61
Abb. 5.5	Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen getrockneter undotier- ter und silberdotierter CMC-stabilsierter Calciumphosphat- Nanopartikel-Dispersionen. . . . .	62
Abb. 5.6	Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen silberdotierter CMC-stabilsierter Calciumphosphat-Nanopartikel. . . . .	62
Abb. 5.7	Mögliche Konformationen adsorbierter Polyelektrolyt-Moleküle auf der Nanopartikeloberfläche. . . . .	64
Abb. 5.8	Energiedispersives Röntgenspektrum von undotierten CMC- stabilisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln. . . . .	65
Abb. 5.9	Energiedispersives Röntgenspektrum von silberdotierten CMC- stabilisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln. . . . .	66
Abb. 5.10	Pulverdiffraktogramme der undotierten und silberdotierten CMC-stabilisierten Calciumphosphat-Nanopartikel. . . . .	67
Abb. 5.11	Pulverdiffraktogramme silberdotierter CMC-stabilsierter Calciumphosphat-Nanopartikel nach der Synthese mit unter- schiedlichen Silbergehalten. . . . .	68
Abb. 5.12	Infrarotspektren von undotierten und silberdotierten CMC-stabilisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln. . . . .	69
Abb. 5.13	Thermogramme von undotierten und silberdotierten CMC-stabilisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln. . . . .	70
Abb. 5.14	Stabilität von CMC-stabilisierten silberdotierten Calciumphosphat-Nanopartikeln in RPMI-Medium mit 10 % FCS. .	71
Abb. 5.15	Strukturformel von Trehalose. . . . .	74

Abb. 5.16 Extinktionsspektren (UV/Vis) von 6-Aminofluorescein und 6-Aminofluorescein-Carboxymethylcellulose. . . . .	76
Abb. 5.17 Konzentrationsabhängige Extinktion von 6-Aminofluorescein. . . . .	77
Abb. 5.18 Dünnschichtchromatographische Untersuchung der 6-Aminofluorescein-Carboxymethylcellulose. . . . .	79
Abb. 5.19 Größenverteilungen (DLS) von F-CMC-stabilisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln. . . . .	80
Abb. 5.20 Größenverteilung (DLS) zentrifugierter und redispergierter F-CMC-stabilsierter Calciumphosphat-Nanopartikel. . . . .	81
Abb. 5.21 F-CMC-stabilisierte Calciumphosphat-Nanopartikel bei Bestrahlung mit UV-Licht. . . . .	82
Abb. 5.22 UV/Vis-Spektrum von F-CMC-stabilisierten Calciumphosphat- Nanopartikeln. . . . .	83
Abb. 5.23 Fluoreszenzspektrum von F-CMC-stabilisierten Calciumphosphat- Nanopartikeln. . . . .	83
Abb. 5.24 Wachstum von <i>E. coli</i> in LB Broth und RPMI-Zellnährmedium. . .	85
Abb. 5.25 Wachstum von <i>S. aureus</i> in LB Broth und RPMI-Zellnährmedium. .	86
Abb. 5.26 Zellvitalität von hMSCs nach der Inkubation mit undotierten Calciumphosphat-Nanopartikeln. . . . .	91
Abb. 5.27 Zellvitalität von hMSCs nach der Inkubation mit Silberacetatlösung.	91
Abb. 5.28 Zellvitalität von hMSCs nach der Inkubation mit silberdotierten Calciumphosphat-Nanopartikeln. . . . .	92
Abb. 5.29 Zellvitalität von PBMCs nach der Inkubation mit undotierten Calciumphosphat-Nanopartikeln. . . . .	93
Abb. 5.30 Zellvitalität von PBMCs nach der Inkubation mit Silberacetatlösung.	93
Abb. 5.31 Zellvitalität von PBMCs nach der Inkubation mit silberdotierten Calciumphosphat-Nanopartikeln. . . . .	94
Abb. 5.32 Silberspezies in RPMI-Medium bei 0 °C und 37 °C als Funktion der Silberkonzentration. . . . .	100
Abb. 5.33 Silberspezies in RPMI-Medium als Funktion der Temperatur. . . . .	101
Abb. 5.34 Sättigungskonzentrationen löslicher Silberspezies in biologischen Medien. . . . .	103
Abb. 5.35 Färbeschema für die CLSM von MG-63-Zellen. . . . .	105
Abb. 5.36 CLSM-Aufnahme von MG-63-Zellen nach der Inkubation mit F-CMC- stabilisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln. . . . .	106

Abb. 5.37 CLSM-Aufnahme von hMSCs nach der Inkubation mit F-CMC-stabilisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln. . . . .	107
Abb. 5.38 Durchflusszytometrische Bestimmung der Endozytose von F-CMC-stabilisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln in hMSCs. . . . .	108
Abb. 5.39 Größenverteilung (DLS) von CS-stabilisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln. . . . .	110
Abb. 5.40 Rasterelektronenmikroskopie von CS-stabilisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln. . . . .	111
Abb. 5.41 Größenverteilungen (DLS) von CS-stabilisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln. . . . .	112
Abb. 5.42 Größenverteilungen (DLS) von CS-stabilisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln nach der Gefriertrocknung. . . . .	113
Abb. 5.43 Rasterelektronenmikroskopie von CS-stabilisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln. . . . .	114
Abb. 5.44 Stabilität von CS-stabilisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln in RPMI-Medium. . . . .	115
Abb. 5.45 Infrarotspektrum von CS-stabilisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln. . . . .	116
Abb. 5.46 Pulverdiffraktogramm von CS-stabilisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln. . . . .	117
Abb. 5.47 Thermogramm von CS-stabilisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln. . . . .	118
Abb. 5.48 Osteogene Differenzierung von hMSCs. . . . .	120
Abb. 5.49 Quantitative Analyse der osteogenen Differenzierung von hMSCs. . . . .	121
Abb. 5.50 Adipogene Differenzierung von hMSCs. . . . .	122
Abb. 5.51 Quantitative Analyse der adipogenen Differenzierung von hMSCs. . . . .	123
Abb. 5.52 Chondrogene Differenzierung von hMSCs. . . . .	124
Abb. 5.53 Gold-Nanopartikel-Dispersionen nach der Reduktion von $\text{HAuCl}_4$ mit $\text{NaBH}_4$ in Gegenwart von Mercaptoethylamin. . . . .	126
Abb. 5.54 Größenverteilungen (DCS) von Gold-Nanopartikeln nach der Reduktion von $\text{HAuCl}_4$ mit $\text{NaBH}_4$ in Gegenwart von Mercaptoethylamin. . . . .	127
Abb. 5.55 Gold-Nanopartikel-Dispersionen nach der Reduktion von $\text{HAuCl}_4$ mit $\text{NaBH}_4$ in Gegenwart von ( <i>RS</i> )-Liponsäure. . . . .	129

Abb. 5.56 Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen von Gold-Nanopartikeln nach der Reduktion von $\text{HAuCl}_4$ mit $\text{NaBH}_4$ in Gegenwart von ( <i>RS</i> )-Liponsäure. . . . .	129
Abb. 5.57 Größenverteilungen (DCS) von Gold-Nanopartikeln nach der Reduk- tion von $\text{HAuCl}_4$ mit $\text{NaBH}_4$ in Gegenwart von ( <i>RS</i> )-Liponsäure. . .	130
Abb. 5.58 Größenverteilungen (DLS) von Gold-Nanopartikeln nach der Reduk- tion von $\text{HAuCl}_4$ mit $\text{NaBH}_4$ in Gegenwart von ( <i>RS</i> )-Liponsäure. . .	131
Abb. 5.59 Größenverteilung (DCS) von Gold-Nanopartikeln nach der Reduk- tion von $\text{HAuCl}_4$ mit Citrat und Gerbsäure. . . . .	132
Abb. 5.60 Größenverteilung (DLS) von Gold-Nanopartikeln nach der Reduk- tion von $\text{HAuCl}_4$ mit Citrat und Gerbsäure. . . . .	133
Abb. 5.61 Größenverteilung (DCS) von Gold-Nanopartikeln nach der Reduktion von $\text{HAuCl}_4$ mit Citrat und Gerbsäure, Zentrifugation und Redispersion in Reinstwasser. . . . .	134
Abb. 5.62 Agarose-Gelelektrophorese von Gold-Nanopartikeln nach der Reduktion von $\text{HAuCl}_4$ mit Citrat und Gerbsäure. . . . .	135
Abb. 5.63 Größenverteilungen (DCS) von Gold-Nanopartikeln nach der Reduk- tion von $\text{HAuCl}_4$ mit Citrat und Gerbsäure und Stabilisierung mit PVP. . . . .	136
Abb. 5.64 Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen von Gold-Nanopartikeln nach der Reduktion von $\text{HAuCl}_4$ mit Citrat und Gerbsäure und Stabilisierung durch PVP. . . . .	137
Abb. 5.65 Größenverteilungen (DLS) von Gold-Nanopartikeln nach der Reduk- tion von $\text{HAuCl}_4$ mit Citrat und Gerbsäure und Stabilisierung mit PVP. . . . .	138
Abb. 5.66 Pulverdiffraktogramm von Gold-Nanopartikeln nach der Reduktion von $\text{HAuCl}_4$ mit Citrat und Gerbsäure und Stabilisierung mit PVP. . . . .	139
Abb. 5.67 Agarose-Gelelektrophorese von PVP-stabilisierten Gold-Nanopar- tikeln nach der Inkubation mit BSA. . . . .	140
Abb. 5.68 Struktur von Rinderserumalbumin (BSA). . . . .	140
Abb. 5.69 Größenverteilungen (DCS) von Gold-Nanopartikeln nach der Reduk- tion von $\text{HAuCl}_4$ mit Citrat und Gerbsäure und Umfunktionalisierung mit Mercaptoethylamin. . . . .	142

Abb. 5.70 Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen von Gold-Nanopartikeln nach der Reduktion von $\text{HAuCl}_4$ mit Citrat und Gerbsäure und Umfunktionalisierung mit MEA. . .	143
Abb. 5.71 Größenverteilungen (DCS) von PVP-stabilisierten Gold-Nanopar- tikeln nach der Reduktion von $\text{HAuCl}_4$ mit Citrat und Gerbsäure und Umfunktionalisierung mit Mercaptoethylamin. . . . .	145
Abb. 5.72 Agarose-Gelelektrophorese von MEA-funktionalisierten Gold-Nanopartikeln. . . . .	146
Abb. 5.73 Größenverteilungen (DCS) von mit ( <i>RS</i> )-Liponsäure umfunktionalisierten Gold-Nanopartikeln. . . . .	147
Abb. 5.74 Größenverteilungen (DCS) von mit ( <i>RS</i> )-Liponsäure umfunktionalisierten PVP-stabilisierten Gold-Nanopartikeln. . . . .	148
Abb. 5.75 Größenvergleich zwischen Gold-Nanopartikeln und IgG-Antikörpern.	150
Abb. 5.76 Agarose-Gelelektrophorese von Antikörper-Gold-Nanopartikel-Konju- gaten. . . . .	152
Abb. 5.77 Größenverteilungen (DCS) von Antikörper-Gold-Nanopartikel-Konju- gaten. . . . .	152
Abb. 5.78 Agarose-Gelelektrophorese von Antikörper-Gold-Nanopartikel-Kon- jugaten ( <i>RS</i> )-Liponsäure-stabilsierter Gold-Nanopartikel. . . . .	154
Abb. 5.79 Agarose-Gelelektrophorese von Antikörper-Gold-Nanopartikel-Kon- jugaten PVP-stabilsierter Gold-Nanopartikel. . . . .	155

# Tabellenverzeichnis

Tab. 2.1	Typische toxikologische Endpunkte zur Beurteilung der Toxizität von Silber und Silberverbindungen. . . . .	10
Tab. 3.1	Zusammensetzung von RPMI zur Berechnung des Anteils löslicher Silberkomplexe und festen Silberchlorids. . . . .	38
Tab. 3.2	Zusammensetzung von DMEM zur Berechnung des Anteils löslicher Silberkomplexe und festen Silberchlorids. . . . .	39
Tab. 4.1	Gold-Nanopartikel funktionalisiert mit unterschiedlichen Liganden. .	46
Tab. 5.1	Mittlere hydrodynamische Durchmesser CMC-stabilsierter Calciumphosphat-Nanopartikel. . . . .	56
Tab. 5.2	Stabilität von silberdotierten CMC-stabilisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln in RPMI mit 10 % FCS. . . . .	72
Tab. 5.3	Parameter der undotierten und der silberdotierten CMC-stabilisierten Calciumphosphat-Nanopartikel. . . . .	73
Tab. 5.4	Silberfreisetzung aus silberdotierten CMC-stabilisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln. . . . .	75
Tab. 5.5	Kolloidchemische Parameter von F-CMC-stabilisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln. . . . .	81
Tab. 5.6	Biologische Wirkung von Silberacetat und Silberacetat mit Zusatz von Trehalose auf <i>E. coli</i> und <i>S. aureus</i> in LB Broth-Medium. . . .	87
Tab. 5.7	Biologische Wirkung von Silberacetat und Silberacetat mit Zusatz von Trehalose auf <i>E. coli</i> und <i>S. aureus</i> in RPMI / 10 % FCS. . . .	88
Tab. 5.8	Biologische Wirkung von silberdotierten CMC-stabilisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln auf <i>E. coli</i> und <i>S. aureus</i> in LB Broth und RPMI / 10 % FCS. . . . .	89
Tab. 5.9	Toxische Konzentrationen von silberdotierten CMC-stabilisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln und von Silberacetat auf hMSCs und PBMCs. . . . .	95
Tab. 5.10	Chloridkonzentrationen in biologischen Medien. . . . .	102

Tab. 5.11	Kolloidchemische Charakterisierung von CS-stabilisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln. . . . .	111
Tab. 5.12	Kolloidchemische Ergebnisse von CS-stabilisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln. . . . .	114
Tab. 5.13	Parameter der CS-stabilisierten Calciumphosphat-Nanopartikel. . .	119
Tab. 5.14	Versuchsparameter der Reduktion von $\text{HAuCl}_4$ mit $\text{NaBH}_4$ in Gegenwart von Mercaptoethylamin. . . . .	126
Tab. 5.15	Versuchsparameter der Reduktion von $\text{HAuCl}_4$ mit $\text{NaBH}_4$ in Gegenwart von ( <i>RS</i> )-Liponsäure. . . . .	128
Tab. 5.16	Verhältnis von BSA-Molekülen zur Goldoberfläche PVP-stabilsierter Gold-Nanopartikel. . . . .	141
Tab. 5.17	Versuchsparameter der Umfunktionalisierung von PVP-stabilisierten Gold-Nanopartikeln mit Mercaptoethylamin. . . . .	144
Tab. 5.18	Verhältnis von ( <i>RS</i> )-Liponsäure zu Gold. . . . .	148
Tab. 5.19	Stoffmengenverhältnisse zwischen Antikörpern und Gold-Nanopartikeln. . . . .	151
Tab. 5.20	Parameter der Konjugation von ( <i>RS</i> )-Liponsäure mit IgG-Antikörpern. . . . .	153



## Abkürzungsverzeichnis

$I$ .....	<u>I</u> ntensität
$K_L$ .....	Löslichkeitsprodukt
$V_1$ .....	molares Volumen des Dispersionsmittels
$V_2$ .....	molares Volumen des Polyelektrolyten
$\Gamma$ .....	Abklingrate
$\Pi$ .....	Spaltdruck
$\beta$ -TCP .....	<u><math>\beta</math></u> - <u>T</u> ri <u>c</u> alcium <u>p</u> hosphat
$\chi$ .....	Flory-Huggins-Wechselwirkungsparameter
$\delta$ .....	Dicke der Polymerhülle
$\eta$ .....	dynamische Viskosität
$\kappa$ .....	Kumulant
$\kappa_H$ .....	Debye-Hückel-Parameter
$\mu$ .....	elektrophoretische Mobilität
$\nu$ .....	Wellenzahl
$\nu_2$ .....	Anzahl der Polyelektrolytmoleküle pro Partikeloberfläche
$\rho$ .....	Dichte
$v$ .....	Strömungsgeschwindigkeit
$\vec{k}_i$ .....	Wellenvektor des einfallenden Lichts
$\vec{k}_s$ .....	Wellenvektor des gestreuten Lichts
$\vec{q}$ .....	Streuvektor
$\zeta$ .....	Zeta-Potential
$h$ .....	Abstand zwischen zwei Nanopartikeln
$r$ .....	Kerndurchmesser eines Nanopartikels
$t$ .....	Zeit
$\tau$ .....	Zeitintervall
$t_M$ .....	Messzeit
$D$ .....	<u>D</u> iffusionskoeffizient
$E. coli$ .....	<u>E</u> scherichia <u>c</u> oli
$G$ .....	<u>G</u> ibbs-Energie
$G_A$ .....	attraktive van-der-Waals-Energie

$G_{T, \text{el}}$ .....	gesamte Gibbs-Energie bei rein elektrostatischer Wechselwirkung
$G_{T, \text{ster}}$ .....	gesamte Gibbs-Energie bei rein sterischer Wechselwirkung
$G_{\text{el}}$ .....	Gibbs-Energie der <u>e</u> lektrostatischen Abstoßung
$G_{\text{max}}$ .....	Maximum der Gibbs-Energie der Energie-Abstandsfunktion $G(h)$
$G_{\text{mix}}$ .....	Gibbs-Mischungsenergie (engl. <i>free energy of <u>m</u>ixing</i> )
$G_{\text{pr}}$ .....	primäres Minimum der Gibbs-Energie
$G_{\text{sek}}$ .....	sekundäres Minimum der Gibbs-Energie
$G_{\text{solv, str}}$ .....	Hydratationsenergie (engl. <i>solvent structure-mediated forces</i> )
$M_{\text{w}}$ .....	mittlere Molmasse (Gewichtsmittel)
$N$ .....	Anzahl unabhängiger Messungen
<i>S. aureus</i> .....	<i><u>S</u>taphylococcus <u>a</u>ureus</i>
$T$ .....	absolute <u>T</u> emperatur
$d_i$ .....	Innendurchmesser des Rohrreaktors
$d_{\text{H}}$ .....	hydrodynamischer Durchmesser
$f$ .....	<u>S</u> trömungskoeffizient
$k_{\text{B}}$ .....	<u>B</u> oltzmann-Konstante
7-AAD .....	<u>7</u> - <u>A</u> mino <u>a</u> ctinomycin <u>D</u>
AAS .....	<u>A</u> tomabsorptionsspektroskopie
AK .....	<u>A</u> ntikörper
BMPs .....	knochenmorphogenetische Proteine (engl. <i>bone <u>m</u>orphogenetic <u>p</u>roteins</i> )
BSA .....	Rinderserumalbumin (engl. <i>bovine serum albumin</i> )
Calcein-AM .....	<u>C</u> alcein- <u>A</u> cetoxym <u>e</u> thylester
CaP-NP .....	<u>C</u> alciumphosphat- <u>N</u> anopartikel
CLSM .....	Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie (engl. <i>confocal laser scanning <u>m</u>icroscopy</i> )
CS .....	<u>C</u> hondroitinsulfat
DAPI .....	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DCS .....	Scheibenzentrifugation (engl. <i>differential centrifugal sedimentation</i> )
DLS .....	Dynamische Lichtstreuung (engl. <i>dynamic light scattering</i> )
DMEM .....	<i><u>D</u>ulbecco's <u>M</u>odified <u>E</u>agle <u>M</u>edium</i>
DMSO .....	<u>D</u> imethylsulfoxid
EDC .....	1- <u>E</u> thyl-3-(3- <u>d</u> imethylaminopropyl) <u>c</u> arbodiimid
EDX .....	Energie-dispersive Röntgenspektroskopie (engl. <i>energy-dispersive <u>X</u>-ray spectroscopy</i> )
ESB .....	Europäische Gesellschaft für Biomaterialien

	(engl. <i>European Society for Biomaterials</i> )
F-CMC .....	6-Aminofluorescein-Carboxymethylcellulose
FACS .....	Durchflusszytometrie (engl. <i>fluorescence activated cell sorting</i> )
FTIR .....	Fourier-Transformations-Infrarotspektroskopie
HEPES .....	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
hMSCs .....	Humane mesenchymale Stammzellen (engl. <i>human mesenchymal stem cells</i> )
HOBt .....	1-Hydroxybenzotriazol
LOAEL .....	<i>lowest observed adverse effect level</i>
MBK .....	Minimale bakterizide Konzentration
MEA .....	Mercaptoethylamin
MES .....	N-Morpholinoethansulfonsäure
MHK .....	Minimale inhibierende Konzentration
MRSA .....	Methicillin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
NaCMC .....	Natrium-Carboxymethylcellulose
NHS .....	N-Hydroxysuccinimid
NOAEL .....	<i>no observed adverse effect level</i>
PBS .....	Phosphatgepufferte Salzlösung
PDI .....	Polydispersitätsindex
PVP .....	Polyvinylpyrrolidon
REM .....	Rasterelektronenmikroskopie
SAM .....	selbstorganisierende Monoschicht (engl. <i>self-assembled monolayer</i> )
SAXS .....	Kleinwinkel-Röntgenstreuung (engl. <i>small angle X-Ray scattering</i> )
TEM .....	Transmissionselektronenmikroskopie
TGA .....	Thermogravimetrische Analyse
TGF- $\beta$ .....	transformierender Wachstumsfaktor (Typ- $\beta$ ) (engl. <i>Transforming Growth Factor</i> )



## Abstract

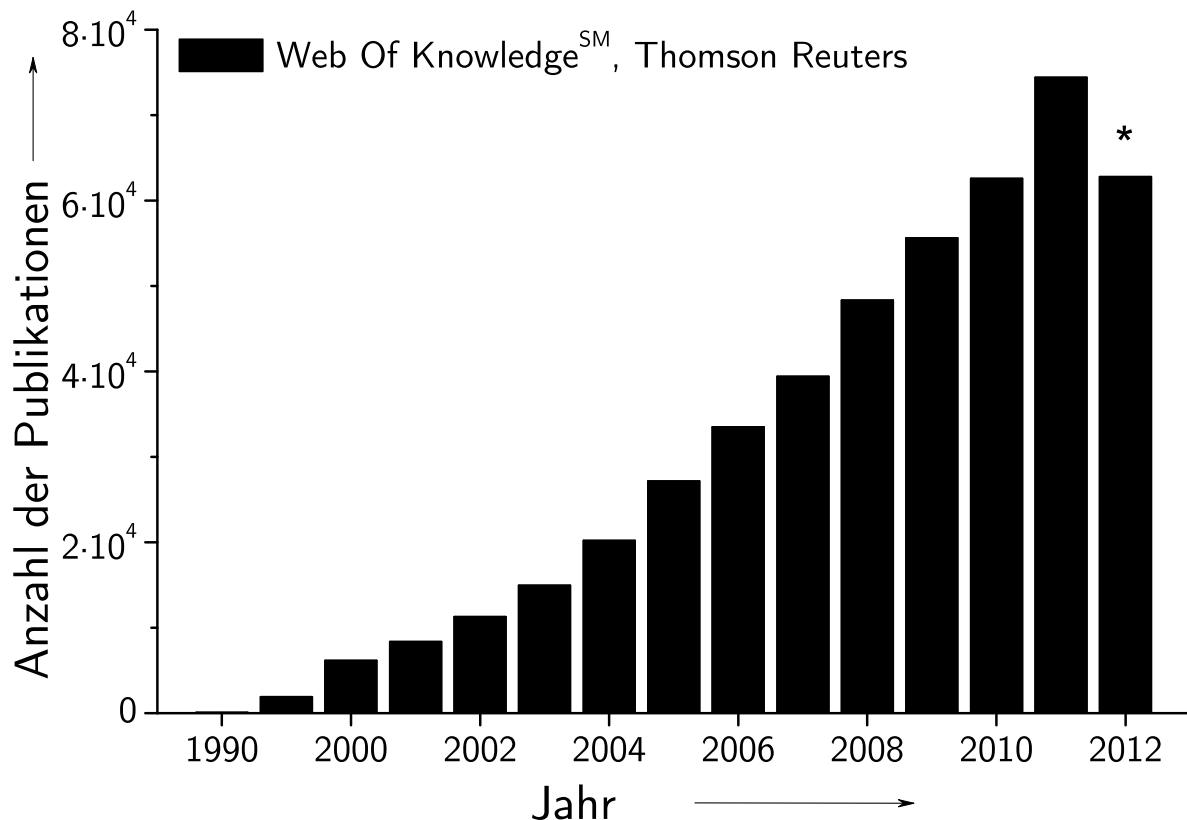
It is commonly held that new strategies are required to face the growing number of bacterial resistances. Due to a lack of new antibiotics, inorganic nanoparticles like silver nanoparticles have attracted attention for antibacterial applications. In this thesis, silver-doped calcium phosphate nanoparticles were synthesized and characterized with regard to their colloid-chemical properties and antibacterial effects towards *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. In comparison, the toxic effects towards mammalian cells, *i. e.* human mesenchymal stem cells and peripheral blood mononuclear cells, were studied in the same culture medium to maintain similar experimental conditions. It was shown that toxic effects of silver-doped calcium phosphate nanoparticles and silver acetate towards bacteria and mammalian cells under similar culture conditions can be observed in the same concentration range. Furthermore, it could be shown that calcium phosphate nanoparticles enhance the osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells while the adipogenic differentiation was reduced.

Beyond antibacterial applications, inorganic nanoparticles like gold nanoparticles are used for bioimaging and drug delivery. In contrast to gold nanoparticle bioconjugates arising from the adsorption of biomolecules to the gold nanoparticle surface, covalently linked bioconjugates are available. While gold nanoparticles are the “gold standard” in studies dealing with the interaction of nanoparticles with biomolecules, the nature of these interactions is still not yet fully understood. In this thesis, the synthesis and characterization of gold nanoparticles and gold nanoparticle bioconjugates are described. The nature of the interaction of gold nanoparticles with antibodies and bovine serum albumin are discussed in the context of differences between covalently and adsorptive interactions within agarose gel electrophoresis experiments. Agarose gel electrophoresis revealed that there are no differences between the retention of covalently linked and adsorptive gold nanoparticle bioconjugates. The findings indicate strong adsorptive interactions between proteins and gold nanoparticles in the absence of a covalent bond. Thus, the synthesis of gold nanoparticle bioconjugates can be achieved due to adsorption without elaborate synthesis strategies.



# 1 Einleitung

Der Begriff Nanomaterialien (von *nános* altgriech. „Zwerg“) taucht seit Mitte der 1990-er Jahre in nahezu allen Disziplinen der Natur- und Ingenieurwissenschaften als neue Klasse von Festkörpern auf, die sich aufgrund ihrer sehr kleinen Abmessungen und daraus resultierender Eigenschaften von herkömmlichen Materialien unterscheiden. Betrachtet man die Anzahl wissenschaftlicher Publikationen pro Jahr, die den Begriff „nano“ enthalten, so lässt sich ein exponentieller Anstieg innerhalb der letzten Jahre erkennen (Abb. 1.1).



**Abb. 1.1:** Anzahl der wissenschaftlichen Publikationen pro Jahr, die den Begriff „nano“ enthalten. Die Suchanfrage wurde mit der Phrase „nanopar\* OR nanomate\* OR nanoscale OR nanotec\* OR nanosc\* OR nanorod\* OR nanowi\* OR nanostr\* OR nanocry\*“ durchgeführt. \*Stand: 11.11.2012

Die Definition des Begriffs Nanomaterial ist durch das Deutsche Institut für Normung e.V. in der internationalen Norm DIN ISO/TS 80004-1 in der aktuellen Fassung von 2010 festgelegt. Ein Nanomaterial ist ein Material mit einem oder mehreren Außenmaß(en) im Nanomaßstab oder mit einer inneren Struktur oder Oberflächenstruktur im Nanomaßstab.<sup>[1]</sup> Der Nanomaßstab schließt Ausdehnungen im Bereich von 1 bis 100 nm ein. Nanopartikuläre Stoffe als enger gefasste Gruppe von Nanomaterialien werden nach der Definition der DIN SPEC 1121 als Nanomaterialien definiert, bei denen alle drei Außenmaße im Nanomaßstab liegen.<sup>[2]</sup> Tatsächlich haben moderne Charakterisierungsmethoden, insbesondere bildgebende und spektroskopische Verfahren, die ubiquitäre Verbreitung nanopartikulärer Stoffe in der Umwelt aufgezeigt. Die Anwesenheit von nanopartikulären Stoffen lässt sich dabei nur zum Teil auf einen anthropogenen Ursprung zurückführen.<sup>[3–5]</sup>

Die technische Anwendung von Nanomaterialien ist seit mehr als 2000 Jahren bekannt.<sup>[6]</sup> Neben Pigmenten zur Anfärbung von Keramiken und Steinzeug (4 Jh. v. Chr.) finden sich in Kirchenfenstern aus dem 17. Jahrhundert Nanopartikel als Pigmente zur Anfärbung von Gläsern.<sup>[7–10]</sup> Die Neuerung, welche zu einem verstärkten Bewusstsein über die Stoffklasse der Nanomaterialien und deren möglicher Anwendungen geführt hat, besteht in der Fähigkeit, seit einigen Jahren derartige Stoffe gezielt herzustellen und zu charakterisieren (Nanotechnologie).<sup>[11–13]</sup> Dabei wurden physikalische und chemische Phänomene entdeckt, die zuvor bei ausgedehnten Festkörpern nicht beschrieben worden waren.<sup>[14–16]</sup> Hierzu zählt der Größenquantisierungseffekt, also die Änderung der physikalischen und chemischen Eigenschaften aufgrund der Ausdehnung von Materialien. Insbesondere optische und elektromagnetische Eigenschaften von Nanopartikeln lassen sich mit den bekannten Beschreibungen für ausgedehnte Festkörper wie der klassischen Newton'schen Mechanik nicht ausreichend erklären.<sup>[11,17]</sup>

Die Verfahren zur Herstellung von Nanomaterialien lassen sich in zwei grundlegende strategische Ansätze einteilen. In den sogenannten *top-down*-Verfahren werden ausgehend von makroskopischen Festkörpern durch mechanische oder physikalisch-chemische Verfahren Nanostrukturen erzeugt. Die Lithographie zählt hier zu den gängigen Techniken zur Herstellung nanoskaliger Leiterbahnen und Kontakten für elektrotechnische Anwendungen.<sup>[18–20]</sup>

In sogenannten *bottom-up*-Verfahren werden Nanomaterialien ausgehend von der Atom- und Molekülebene durch physikalisch-chemische Prozesse aufgebaut.<sup>[21–25]</sup> Auf diese Weise können noch kleinere Strukturen mit genauer definierten Eigenschaften hergestellt werden.<sup>[20]</sup> Die zugrunde liegenden Reaktionen erstrecken sich über die gesamte Bandbreite der Reaktionen organischer und anorganischer Stoffe in flüssiger Phase über heterogene Fluid-Feststoff-Reaktionen bis hin zu Festkörperreaktionen.<sup>[17,23,26]</sup>



---

Neben den rein synthetisch chemischen Reaktionen können auch Strukturen im Nanometermaßstab durch gezielte Veränderung oder Selbstorganisation von biologischen Systemen, wie Proteinen und Peptiden<sup>[27–32]</sup>, Nukleinsäuren<sup>[33–36]</sup> und Phospholipiden<sup>[37–40]</sup> erzeugt werden.<sup>[21,33,41–43]</sup>

Für medizinische Anwendungen ist das Interesse an organisch-anorganischen Hybridmaterialien und Kompositen, bei denen mechanische und physikalisch-chemische Eigenschaften der anorganischen Komponenten mit biochemischen Eigenschaften der organischen Bestandteile kombiniert werden, stetig gewachsen.<sup>[44–46]</sup> In der Medizin gilt der Begriff des Biomaterials als wichtiger Sammelbegriff für Materialien im direkten Kontakt mit zellulärem Gewebe und/oder Körperflüssigkeiten wie Blut, Urin oder Lymphe. Die Europäische Gesellschaft für Biomaterialien (ESB) definiert ein Biomaterial als ein nicht lebendes Material in einem medizinischen Produkt, welches zur Interaktion mit biologischen Systemen eingesetzt wird.<sup>[47]</sup> Derartige Materialien können defekte Körperfunktionen substituieren oder eingeschränkte Körperfunktionen unterstützen. Dazu wurde der Begriff der Biokompatibilität als Eignungskriterium eines Biomaterials für medizinische Anwendungen eingeführt.

Biokompatibilität wird als Verträglichkeit zwischen einem technischen und einem biologischen System definiert.<sup>[48]</sup> Dabei wird bei der statischen Biokompatibilität zwischen Struktur- (mechanische Eigenschaften) und Oberflächenkompatibilität (chemische, physikalische, biologische und morphologische Eigenschaften) unterschieden. Hinzu kommt die dynamische Kompatibilität, welche eine Zeitkomponente, also die Wirkdauer des Biomaterials in Kontakt mit Gewebe, beinhaltet.<sup>[48]</sup> Während Anderson *et al.* Biokompatibilität als die Ungefährlichkeit von medizinischen Produkten bezeichnen<sup>[49]</sup>, bemühte sich Williams um eine enger gefasste Definition des Begriffs, indem er die Bedeutung der Interaktion des Biomaterials mit dem umliegenden biologischen System in der spezifischen Anwendung hervorhob. Nach Williams wird unter einem Biomaterial ein Material verstanden, das allein oder als Teil eines komplexeren Systems die Funktion besitzt, einen diagnostischen oder therapeutischen Verlauf durch die Wechselwirkung mit lebenden Systemen zu steuern.<sup>[50,51]</sup>

Neben biokompatiblen makroskopischen Materialien können biokompatible Nanopartikel eingesetzt werden, um Wechselwirkungen mit biologischem Material auf zellulärer Ebene einzugehen. Aufgrund ihrer nanoskaligen Ausdehnung wird ihnen im Kontakt mit biologischem Material ein hohes Potential für medizinische Anwendungen vorausgesagt.<sup>[52]</sup> Nanopartikel gelten mittlerweile in der Tat als wichtige Träger von Wirkstoffen, als Kontrastmittel auf zellulärer Ebene und als Vektoren für die Gentherapie.<sup>[53–55]</sup> Für die Anwendung von Nanopartikeln in Kontakt mit intra- und/oder extrazellulären Gewebebe-

standteilen werden neben der Größe der Nanopartikel besondere Anforderungen an die Oberflächenchemie und die Zusammensetzung gestellt.<sup>[56,57]</sup>

Die Risiken von Nanopartikeln für den menschlichen Organismus werden derweil kontrovers diskutiert. Neben dem erhofften Nutzen von nanoskaligen Biomaterialien bergen sie auch Risiken, deren Abschätzung sich die Nanotoxikologie widmet.<sup>[3,58–64]</sup>

Diese Arbeit befasst sich mit der Synthese und Charakterisierung von Calciumphosphat- und Gold-Nanopartikeln. Es werden die Synthese und kolloidchemische Charakterisierung von Polyelektrolyt-stabilisierten silberdotierten und undotierten Calciumphosphat-Nanopartikeln vorgestellt und ihre biologische Wirkung gegenüber Bakterien und humanen Zellen *in vitro* diskutiert.

Darüber hinaus wird die Synthese und kolloidchemische Charakterisierung von unterschiedlich funktionalisierten Gold-Nanopartikeln dargestellt. Verschiedene Strategien zur Funktionalisierung der Gold-Nanopartikel mit Antikörpern werden vorgestellt und die kolloidchemische Charakterisierung der Antikörper-Gold-Nanopartikel-Konjugate wird diskutiert.

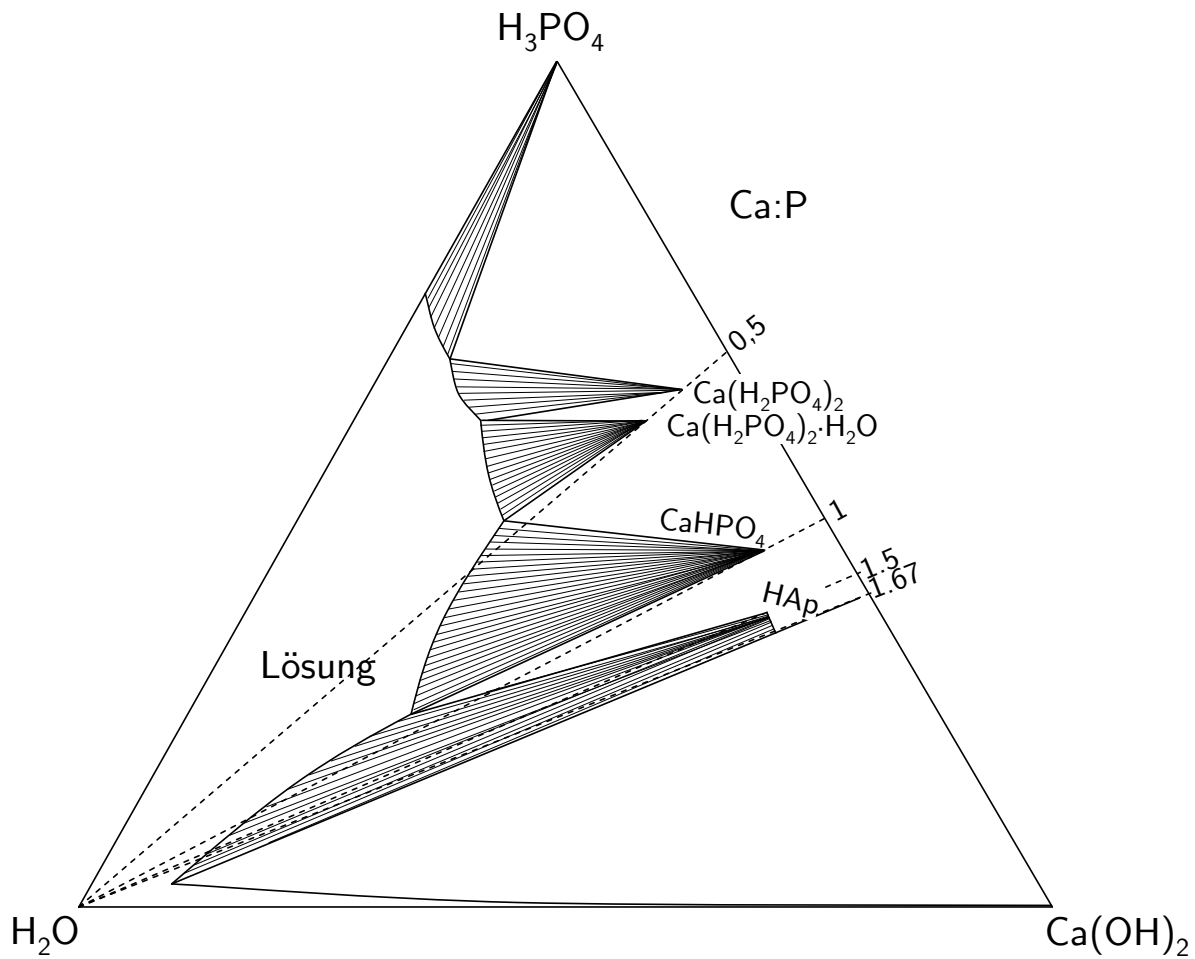
## 2 Theoretischer Teil

### 2.1 Calciumphosphat-Nanopartikel

Calciumphosphate kommen als anorganischer Bestandteil im menschlichen Organismus in vielen Hartgeweben, vor allem in Knochen (ca. 60 bis 70 %) und Zähnen (Enamel ca. 97 %, Dentin ca. 70 %) vor.<sup>[48,65–67]</sup> Es gibt eine Vielzahl von stöchiometrisch unterschiedlich zusammengesetzten Calciumphosphaten. In wässriger Lösung können durch die Protonierung des Orthophosphats ( $\text{PO}_4^{3-}$ ), als konjugierte Base der Phosphorsäure ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ), je nach Lage des Protolysegleichgewichts Hydrogenphosphat- ( $\text{HPO}_4^{2-}$ ) und Dihydrogenphosphat-Ionen ( $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ) vorliegen. Alle drei Spezies können mit  $\text{Ca}^{2+}$  Salze bilden. In neutraler und alkalischer Lösung sind diese Salze gering bis schwer löslich. Alle Calciumphosphatsalze können in saurer Lösung gelöst werden.<sup>[66]</sup>

Ein vereinfachtes ternäres Phasendiagramm für das System  $\text{CaO-P}_2\text{O}_5\text{-H}_2\text{O}$  bei 25 °C und einem Druck von  $1,01325 \cdot 10^5$  Pa ist in Abbildung 2.1 gezeigt.<sup>[68]</sup> Die Anteile der drei Komponenten sind als Molenbrüche der fünften Wurzel der Stoffmengen aufgetragen. Es lässt sich erkennen, dass Hydroxylapatit ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ) mit einem stöchiometrischen Verhältnis von Calcium zu Phosphat von 1,67 das am schwersten lösliche Calciumphosphat darstellt. Die Niedertemperaturphase  $\beta$ -Tricalciumphosphat ( $\beta$ -TCP) des „reinen“ Calciumorthophosphats  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  kann nicht aus wässriger Lösung gefällt werden und entsteht nur durch Calcinieren bei Temperaturen oberhalb von 800 °C. Bei der Fällung von Calciumphosphaten aus wässriger Lösung wird bei niedrigen Temperaturen häufig die Zusammensetzung eines Calcium-defizitären Hydroxylapatits mit einem Verhältnis von Calcium zu Phosphat von 1,33 bis 1,65 beobachtet.<sup>[69]</sup>

Der schematische Verlauf der Bildung eines schwerlöslichen Salzes bei konstanter Erhöhung der Eduktkonzentrationen als Funktion der Zeit ist in Abbildung 2.2 gezeigt.<sup>[70]</sup> Im Bereich **A** kann das System einen metastabilen (übersättigten) Zustand einnehmen, wobei die kritische Übersättigung noch nicht erreicht ist und sich keine Keime bilden. Die Keimbildungsrate  $R_N$  ist gleich Null. Im Bereich **B** ist die kritische Übersättigung überschritten und es tritt spontane Keimbildung ein. Mit steigender Keimzahl sinkt die Keimbildungsrate ( $R_N \rightarrow 0$ ). Im Bereich **C** wachsen die Keime zu größeren Partikeln, bis die Sättigungskonzentration erreicht ist ( $R_N = 0$ ). Das System strebt dabei eine Minimierung

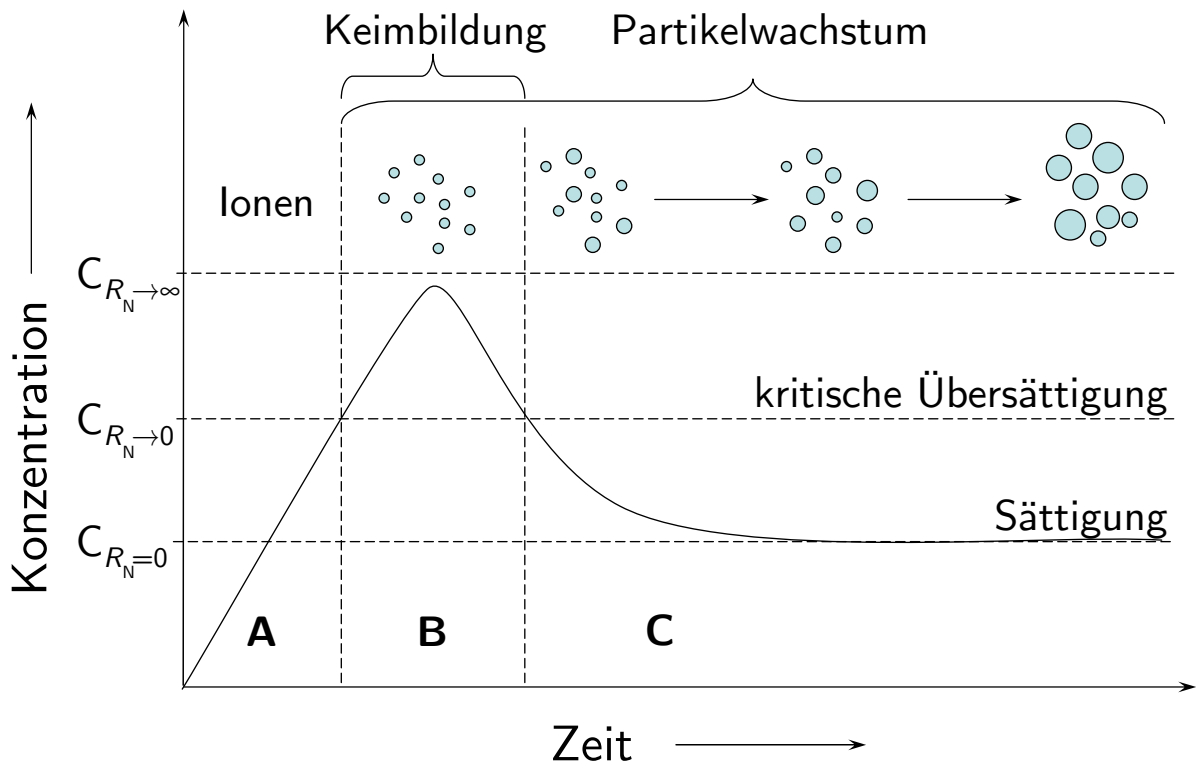


**Abb. 2.1:** Ternäres Phasendiagramm  $\text{CaO-P}_2\text{O}_5\text{-H}_2\text{O}$  bei  $25\text{ °C}$  und einem Druck von  $1,01325 \cdot 10^5\text{ Pa}$ .<sup>[68]</sup>

der Oberflächenspannung und damit der Minimierung der freien Energie an. Kleine Kristalle lösen sich aufgrund ihrer höheren Oberflächenspannung auf, größere Partikel wachsen (Ostwald-Reifung).<sup>[71–73]</sup>

Neben dem Einsatz von Calciumphosphaten in makroskopischen Biomaterialien und Beschichtungen von Implantaten können auch nanoskalige Calciumphosphate hergestellt werden.<sup>[65,74,75]</sup> Calciumphosphat-Nanopartikel (CaP-NP) können in wässriger Lösung in einer Fällungsreaktion durch Einleiten von  $\text{H}_3\text{PO}_4$  in eine Lösung von  $\text{Ca(OH)}_2$  oder aus Calcium- und Phosphatsalzen dargestellt werden.<sup>[76–82]</sup>

Sie bestehen aus einem anorganischen Calciumphosphat-Kern und lassen sich durch eine Hülle aus Polyelektrolyten in wässriger Dispersion stabilisieren.<sup>[83–86]</sup> Nicht stabilisierte Calciumphosphat-Nanopartikel neigen zur raschen Aggregation unter Ausbildung von Flocken. Neben kugelförmigen Morphologien können auch stäbchenförmige Calciumphos-



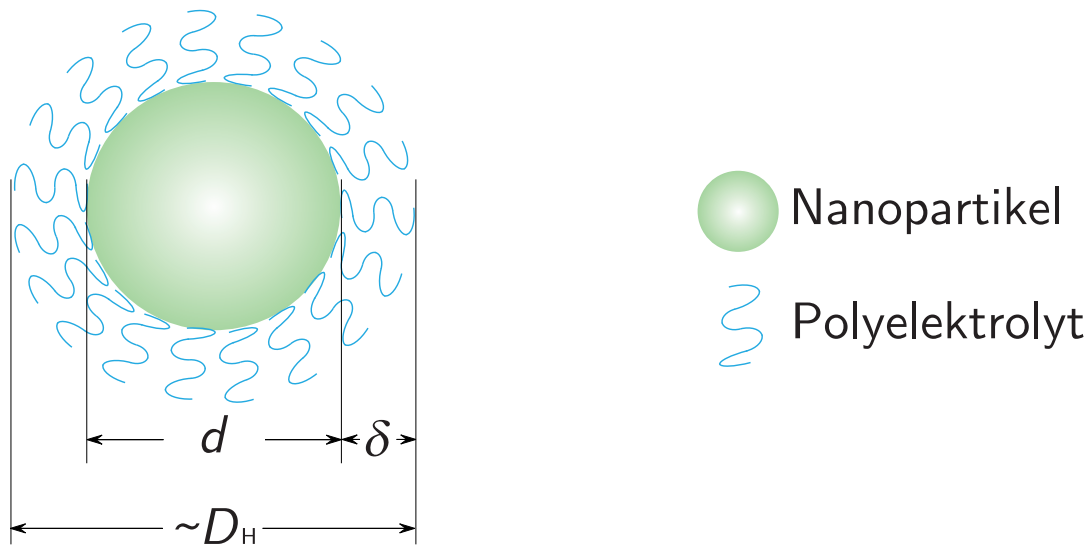
**Abb. 2.2:** Schematische Darstellung der Keimbildung und des Partikelwachstums als Funktion der Zeit. Ist die kritische Übersättigung überschritten (B), setzt eine spontane Keimbildung mit nachfolgendem Partikelwachstum ein (C).<sup>[70]</sup>

phat-Nanopartikel synthetisiert werden, deren Kristallinität durch die Synthesebedingungen beeinflusst werden kann.<sup>[83,86–88]</sup>

Die chemischen Eigenschaften der stabilisierenden Polyelektrolyten bestimmen maßgeblich die chemischen Eigenschaften der Nanopartikel. Calciumphosphat-Nanopartikel können zur Transfektion von eukaryotischen Zellen eingesetzt werden. Dabei werden Nukleinsäuren mit Calciumphosphat-Nanopartikeln in Zellen eingeschleust. Eine einfache Darstellung von Calciumphosphat-DNA-Partikeln durch Zugabe von  $\text{CaCl}_2$  und phosphatgepufferter Kochsalzlösung zu einer DNA-Lösung wurde von Graham *et al.* beschrieben und weiterentwickelt.<sup>[89–91]</sup> Die durch das anionische Desoxyribose-Phosphat-Rückrad komplexierten Calciumionen bilden Keime für die Fällung von Calciumphosphat-Partikeln.<sup>[92,93]</sup> Die hierbei entstehenden Partikel können von eukaryotischen Zellen durch endozytotische Aufnahme internalisiert werden.<sup>[57,94–97]</sup>

Nach Sokolova *et al.* können Calciumphosphat-Nanopartikel mit diversen Nukleinsäuren und weiteren Polyelektrolyten nach dem *Layer-by-Layer*-Verfahren beschichtet werden. Als stabilisierende Polyelektrolyten dienen dabei anionische Polyelektrolyte wie Nukle-

insäuren (DNA, mRNA, siRNA) oder alternierende Lagen aus Nukleinsäuren, kationischen Polyelektrolyten oder weiteren Calciumphosphat-Schichten.<sup>[94,98–105]</sup> Calciumphosphat-Nanopartikel lassen sich auch mit Photosensibilisatoren beladen und in der photodynamischen Therapie einsetzen.<sup>[106,107]</sup> Fluoreszierende Calciumphosphat-Nanopartikel lassen sich durch das Dotieren des anorganischen Calciumphosphat-Kerns mit Lanthanoiden oder durch die Stabilisierung mit Fluoreszenz-markierten Polyelektrolyten realisieren.<sup>[108–110]</sup> Abbildung 2.3 zeigt schematisch einen Polyelektrolyt-stabilisierten Calciumphosphat-Nanopartikel.



**Abb. 2.3:** Schematische Darstellung eines Polyelektrolyt-stabilisierten Calciumphosphat-Nanopartikels. Der hydrodynamische Durchmesser ( $D_H$ ) ergibt sich als Summe aus dem Partikeldurchmesser ( $d$ ) und der Dicke der Polyelektrolythülle ( $\delta$ ).

## 2.2 Verwendung von Silber als antimikrobiellem Wirkstoff

Die Resistenz von pathogenen Bakterien gegenüber herkömmlichen Antibiotika, wie den  $\beta$ -Lactam-Antibiotika, nimmt stetig zu.<sup>[111–120]</sup> Obschon immer neue Antibiotika entwickelt werden, geht gleichzeitig die Gesamtzahl an wirksamen Medikamenten deutlich zurück.<sup>[118]</sup> Neben der großen Problematik in der Behandlung Methicillin-resistenter *Staphylococci aurei* (MRSA) treten immer mehr Fälle von resistenten Enterokokken auf. MRSA- und Enterokokken-Infektionen treten häufig als Krankenhausinfektionen (nosokomiale Infektionen) auf.<sup>[112–115,121–123]</sup> In vielen Fällen zeigen MRSA neben den  $\beta$ -Lactam-Antibiotika-Resistenzen auch Resistenzen gegenüber anderen Antibiotika. In zunehmendem Maße tre-

ten auch Resistenzen gegenüber den letzten wirksamen Reserveantibiotika, wie Vancomycin, auf.<sup>[124,125]</sup> Insbesondere in Krankenhäusern stellen resistente Bakterienstämme eine große Gefahr für die Patienten dar und lassen sich zum Teil nicht erfolgreich behandeln. Obwohl die Resistenzbildung in der Regel mit einer Abnahme der reproduktiven Fitness (*fitness cost*) nach dem Ende der Antibiotikatherapie einhergeht, lässt sich eine Reversibilität der Resistenzen nur sehr langsam beobachten.<sup>[120,126]</sup>

Die Gründe für die Ausbildung von Resistenzen sind noch vielfältiger als die zellulären Wirkmechanismen der eingesetzten Antibiotika.<sup>[118,119,127]</sup> Mit einsetzender und stetig wachsender Globalisierung und der damit verbundenen Mobilität haben sich resistente Bakterienstämme auch außerhalb von medizinischen Einrichtungen weit verbreitet.<sup>[114,117,122]</sup> Der unsachgemäße Umgang mit Antibiotika verstärkt diesen Trend. Dazu zählen der systematische Einsatz von Antibiotika in der Tierzucht, die sehr hohe Zahl an Verschreibungen ohne dringende Indikation einer Antibiotikatherapie oder nicht zu Ende geführte Therapien.<sup>[119,120,127,128]</sup> Geringe Antibiotikakonzentrationen in der Umwelt begünstigen dabei die Verbreitung an resistenten Bakterien.<sup>[129]</sup> In bevölkerungsreichen Schwellenländern wie China und Indien besteht ein großes Potenzial für die weitere Ausbreitung und das Auftreten neuer Resistenzen.<sup>[114,122]</sup>

Unter dem Gesichtspunkt steigender Resistenzen pathogener Bakterien ist das Interesse an alternativen Behandlungskonzepten groß.<sup>[130]</sup> Die stetige Entwicklung neuer Behandlungskonzepte spielt dabei eine zentrale Rolle im Umgang mit infektiösen, schwer behandelbaren Krankheiten.<sup>[119,120,131]</sup>

Silber ist dabei als (alter) bekannter antibakterieller Wirkstoff erneut in den Fokus der Forschung gerückt. Die Verwendung von Silber und Silberverbindungen zur Desinfektion von Wunden und zur Konservierung von Trinkwasser lässt sich über das Mittelalter zurück bis in die griechische Antike datieren.<sup>[132–137]</sup> Die ersten wissenschaftlichen Veröffentlichungen zu den antiseptischen und entzündungshemmenden Eigenschaften von Silber, insbesondere von Silbernitratlösungen, wurden ab Mitte des 19. Jahrhunderts beschrieben.<sup>[138–140]</sup> Die ersten kommerziell erhältlichen medizinischen silberhaltigen Produkte wurden als Antiseptika zur Behandlung von schweren Verbrennungen und großen Wunden eingesetzt.<sup>[141]</sup> Mittlerweile gibt es eine Vielzahl an medizinischen Produkten, wie antibakterielle Implantatoberflächen, Beschichtungen von Kathetern, Wundabdeckungen und Verbandmaterialien, die Silber enthalten.<sup>[133,134,142–145]</sup> Diese Produkte setzen Silber oder Silberionen frei und sollen die Besiedlung der Oberfläche mit Bakterien verhindern.

Obwohl die antimikrobielle Wirkung von Silber lange bekannt ist, sind die detaillierten Wechselwirkungen mit Zellen weitgehend ungeklärt. Trotz einer Vielzahl an Publikationen lassen sich die ermittelten toxischen Konzentrationen, welche unterschiedliche toxikologi-

sche Endpunkte beschreiben, schlecht vergleichen.

In Tabelle 2.1 sind die am häufigsten bestimmten Endpunkte toxikologischer Studien zu Silber aufgelistet, deren Vergleichbarkeit untereinander nicht gewährleistet ist.<sup>[146–150]</sup>

**Tab. 2.1:** Typische toxikologische Endpunkte zur Beurteilung der Toxizität von Silber und Silberverbindungen.<sup>[146–150]</sup>

Parameter	Definition
LC <sub>50</sub>	Letale Konzentration, bei der die Hälfte der Testorganismen im genannten Expositionszeitraum stirbt (g L <sup>-1</sup> oder mol L <sup>-1</sup> )
EC <sub>50</sub>	Effektive Konzentration, bei der in 50 % der Testorganismen im genannten Expositionszeitraum ein Effekt beobachtet wird (g L <sup>-1</sup> oder mol L <sup>-1</sup> )
EC <sub>20</sub>	Effektive Konzentration, bei der in 20 % der Testorganismen im genannten Expositionszeitraum ein Effekt beobachtet wird (g L <sup>-1</sup> oder mol L <sup>-1</sup> )
NOAEL	Konzentration, bei der gerade noch kein schädlicher Effekt in Testorganismen beobachtet wird (mg kg <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )
LOAEL	niedrigste Konzentration, bei der gerade noch kein schädlicher Effekt in Testorganismen beobachtet wird (mg kg <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )
NOEC	Konzentration, bei der gerade noch kein Effekt in Testorganismen beobachtet wird (mg kg <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )
MATC	maximale tolerierbare Konzentration, bei der kein toxischer Effekt in Testorganismen beobachtet wird (g L <sup>-1</sup> oder mol L <sup>-1</sup> )

Die biologische Aktivität von Silber wird Silberionen zugesprochen, wobei die Effekte von metallischem Silber und Silbersalzen in partikulärer Form nicht eindeutig geklärt sind.<sup>[151–153]</sup> Die zunehmende Verwendung von Silber in medizinischen Produkten, Kosmetika und Textilien wird daher kontrovers diskutiert.<sup>[135,136,150,153–161]</sup>

Die Freisetzung von Silber aus Konsumgütern wird auf einige hundert Tonnen pro Jahr geschätzt.<sup>[154,162,163]</sup> Insbesondere in den vergangenen Jahren wurden einige umfangreiche Publikationen zur toxikologischen und antibakteriellen Relevanz von Silber und Silber-Nanopartikeln veröffentlicht.<sup>[135,136,150,153,154,157,164]</sup> Obwohl nanopartikuläres Silber und Silberverbindungen derart weit verbreitet eingesetzt werden und potentielle toxische Effekte gegenüber der Umwelt und auf den Menschen bei Exposition vorliegen, gibt es keine gültige Rechtsvorschrift, welche die Verbreitung und Anwendung von Produkten mit nanopartikulärem Silber reglementiert.<sup>[155]</sup>



Trotz dieser beachtlichen Datenlage kann kaum eine allgemeingültige toxikologische Einstufung von nanopartikulärem Silber vorgenommen werden. Die zugrunde liegenden Expositionsszenarien und die Wirkung gegenüber verschiedenen Organismen können grundlegend verschieden sein.<sup>[152]</sup>

Aquatische Lebewesen zeigen eine deutlich höhere Sensitivität gegenüber der Exposition von Silber in ionischer oder nanopartikulärer Form. Die toxischen Konzentrationen für Algen, Krebstiere und Fische ( $0,5$  bis  $50 \mu\text{g L}^{-1}$ ) liegen um drei Größenordnungen unter den toxischen Konzentrationen, die für eukaryotische Zelllinien *in vitro* angegeben werden ( $0,2$  bis  $250 \text{ mg L}^{-1}$ ).<sup>[165–174]</sup> Die toxischen Konzentrationen für marine Algen liegen je nach Algenart und Silberspezies im Bereich von  $2$  bis  $125 \mu\text{g L}^{-1}$ .<sup>[146]</sup> Die publizierten wachstumhemmenden und toxischen Konzentrationen von Silber in ionischer oder nanopartikulärer Form gegenüber Bakterien liegen im Bereich von  $1 \text{ ng L}^{-1}$  bis  $220 \text{ mg L}^{-1}$  und streuen sehr stark.<sup>[175–183]</sup> Einige Bakterienstämme zeigen eine große Toleranz gegenüber Silber, so dass erst sehr hohe Konzentrationen ( $> 100 \text{ mg L}^{-1}$ ) eine Wirkung zeigen.<sup>[175,184]</sup> *In vivo* Studien zur Bestimmung von toxischen Konzentrationen gegenüber Säugetieren sind kaum durchgeführt worden.<sup>[146,150,153,154]</sup> Die ermittelten Endpunkte (NOAEL und LOAEL) liegen bei Mäusen und Ratten im Bereich von  $1,68$  bis  $362,4 \text{ mg kg}^{-1} \text{ d}^{-1}$ .<sup>[150]</sup>

Durch die schwer realisierbare Ermittlung toxikologischer Daten für den Menschen, die sich in der Regel aus der Analyse von Unfalldaten und Vergiftungsfällen zusammensetzen, ist die Datenlage sehr dünn.<sup>[136,150]</sup> Die auf die Exposition von Silber zurückzuführende Erscheinung der *Argyrie*, einer Verfärbung der Haut durch den Kontakt oder die Einnahme von Silber, wurde 2005 von Drake *et al.* zusammengefasst und liefert keine signifikanten toxikologischen Daten.<sup>[160]</sup> Die europäische Union setzte im Jahr 2008 einen Beschluss der europäischen Kommission um, der die Etablierung eines wissenschaftlichen Komitees zur Beurteilung neuer Gesundheitsrisiken (*Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks, SCENIHR*) vorsah.<sup>[185]</sup> Dieses Komitee befasst sich bis Ende 2012 mit einer Risikobeurteilung von nanopartikulärem Silber („*Nanosilver: safety, health and environmental effects and role in antimicrobial resistance*“).

Die Erforschung der Wirkung von Silber in ionischer und partikulärer Form gegenüber dem Menschen und der Umwelt wird weiterhin Gegenstand wissenschaftlicher Untersuchungen sein, bis eine abschließende Einschätzung des toxikologischen Potentials vorliegt.<sup>[150,185]</sup>

Silber wurde in Verbindung mit verschiedenen Calciumphosphaten, insbesondere Hydroxylapatit, als Beschichtung für Implantate oder als Knochenersatzmaterial vorgeschlagen.<sup>[186–196]</sup> Ein derartiges Biomaterial verspricht einerseits einen antibakteriellen Effekt durch das eingebettete Silber und andererseits eine verbesserte Wundheilung und Osseointegration. Toxikologische Untersuchungen zu diesen Materialien sind nur in gerin-

gem Umfang durchgeführt worden. Dabei wurde zumeist nur die biologische Wirkung auf prokaryotische oder auf eukaryotische Zellen untersucht. Roy *et al.* beobachtet eine antibakteriellen Effekt von silberdotierten Hydroxylapatitschichten mit einem Silbergehalt von 2 bis 6 %. Im Bereich von 2 bis 4 % Silber zeigte die Beschichtung eine antibakterielle Wirkung und zugleich keinen toxischen Effekt auf die humane Osteoblastenzelllinie hFOB 1,19.<sup>[194]</sup> Sandukas *et al.* beobachteten ab einem Silbergehalt von 3 % eine zytotoxische Wirkung von silberdotierten Hydroxylapatitschichten. Eine systematische Analyse der biologischen Wirkung eines derartigen Materials gegenüber Bakterien und humanen Zellen wurde bisher jedoch nicht durchgeführt.

Unter dem Gesichtspunkt einer vergleichbaren Ermittlung biologisch wirksamer Silberkonzentrationen werden in dieser Arbeit toxische Konzentrationen gegenüber eukaryotischen und prokaryotischen Zellen unter gleichen äußeren Bedingungen ermittelt. Im Hinblick auf eine therapeutische Anwendung zur Behandlung einer Bakterieninfektion in infiziertem Gewebe können die äußeren Bedingungen wie organische Liganden, Ionenspezies, die Ionenstärke in einer wässrigen Phase (Wundflüssigkeit, Gewebeflüssigkeit) und die Temperatur, einen großen Einfluss auf die toxische Aktivität von Silber haben.<sup>[153]</sup>

Die toxikologischen Endpunkte für Silber können aufgrund der biologischen Unterschiede zwischen Prokaryonten und Eukaryonten nicht vereinheitlicht werden.<sup>[135]</sup> Es werden im Folgenden verschiedene Endpunkte diskutiert, welche zur Ermittlung des toxischen Effekts von Silberionen und silberdotierten Calciumphosphat-Nanopartikeln herangezogen wurden. Die äußeren Parameter wie Temperatur und Zusammensetzung des Nährmediums wurden bei den biologischen Experimenten konstant gehalten.

### 2.3 Gold-Nanopartikel

Die Faszination des Menschen für das Edelmetall Gold lässt sich bis zu den ersten Hochkulturen der Menschheit belegen.<sup>[8,197]</sup> Mit der Verwendung von Gold zur Färbung von Gläsern im 17. Jahrhundert lassen sich die Anfänge der technischen Nutzung kolloidaler Systeme dokumentieren. Während in der Alchemie des Mittelalters Gold eine zentrale Rolle spielte, ein aus heutiger Sicht wissenschaftliches Verständnis allerdings noch fehlte, wurden wissenschaftliche Untersuchungen zur Reduktion von Tetrachlorogoldsäure mit Phosphor erstmals 1857 von Faraday beschrieben.<sup>[197–200]</sup> Das wissenschaftliche Interesse nahm seither stetig zu, wobei erst moderne Analyse- und Charakterisierungsmethoden wie die elektronenmikroskopischen Verfahren zu einem besseren Verständnis kolloidaler Systeme geführt haben.<sup>[201,202]</sup>

Als Gold-Nanopartikel werden metallische Goldpartikel bezeichnet, deren Abmessungen

im Bereich von einigen wenigen bis etwa 50 nm liegen.<sup>[203]</sup> Kleinere Partikel bis hin zu Verbänden aus einzelnen Goldatomen werden als Gold-Cluster bezeichnet.<sup>[197,204]</sup> Neben der Reduktion des Tetrachlorogold-Komplexes in organischen Lösemitteln durch starke Reduktionsmittel wie Natriumborhydrid kann die Reduktion der Tetrachlorogoldsäure mit Trinatriumcitrat in wässriger Lösung durchgeführt werden.<sup>[205–208]</sup> Durch Abwandlungen der Methode nach Turkevich *et al.* können Gold-Nanopartikel verschiedener Größen dargestellt werden.<sup>[209]</sup> Neben kugelförmigen Gold-Nanopartikeln können durch geeignete Liganden und Synthesebedingungen verschiedene Geometrien wie Würfel, Stäbchen oder Polyeder erzeugt werden.<sup>[197,210–215]</sup> Durch die Reduktion mit einem Gemisch aus Trinatriumcitrat und Gerbsäure lassen sich monodisperse kugelförmige Gold-Nanopartikel mit einem mittleren Durchmesser von 5 nm darstellen.<sup>[216]</sup> Die Oberfläche der Gold-Nanopartikel lässt sich mit Liganden funktionalisieren. Durch geeignete heterofunktionale Liganden kann die Oberfläche mit funktionellen Gruppen ausgestattet werden. Am weitesten verbreitet sind Thiol-, Amin-, Disulfid-, Phosphan- und Carboxylatliganden.<sup>[217,218]</sup>

Gold wird in der Biologie häufig als kugelförmiges Nanopartikel für mikroskopische Zwecke verwendet.<sup>[219,220]</sup> Beim *immunogold staining* werden sekundäre Antikörper mit kolloidalen Goldpartikeln markiert. Durch Bindung der sekundären Antikörper an Epitop-gebundene primäre Antikörper können gezielt Bereiche in Zellen und Geweben kontrastiert werden. Elektronenmikroskopisch lassen sich diese Bereiche durch einen starken Kontrast der dichten Gold-Nanopartikel von biologischem Material unterscheiden. Die Behandlung mit Antikörper-gebundenen Gold-Nanopartikeln wird in der Regel nach der Fixierung und Permeabilisierung der Zellen oder des Gewebes durchgeführt.<sup>[221,222]</sup>

In der biomedizinischen Forschung werden Gold-Nanopartikel zunehmend als Trägermaterial oder Teil eines Wirkstoffsystems für medizinische Zwecke untersucht. Liganden wie Proteine, Peptide oder Oligonukleotide können dabei chemisorbiert oder kovalent an der Goldoberfläche gebunden sein.<sup>[218,223–226]</sup> Insbesondere in der Krebstherapie verspricht man sich durch die gezielte Adressierung von Krebszellen einen therapeutischen Erfolg.<sup>[227]</sup> Neben zahlreichen *in vitro* Studien sind in den letzten Jahren auch *in vivo* Studien für die Adressierung von erkranktem Gewebe (*Drug Delivery*) publiziert worden.<sup>[218,220,225,226,228–230]</sup> Die *in vivo* Effizienz von Antikörper-funktionalisierten Nanopartikeln liegt deutlich unter der in *in vitro* Experimenten ermittelten Effizienz. Der Großteil der in den Organismus eingebrachten Nanopartikel wird in der Leber oder den Nieren akkumuliert oder ausgeschieden.<sup>[231]</sup>

Die verschiedensten Methoden zur Konjugation von Gold-Nanopartikeln mit Biomolekülen sind in der Literatur beschrieben.<sup>[232]</sup> Die Wechselwirkungen zwischen den Gold-Nanopartikeln und den konjugierten Biomolekülen sind dabei häufig nicht genau bekannt.

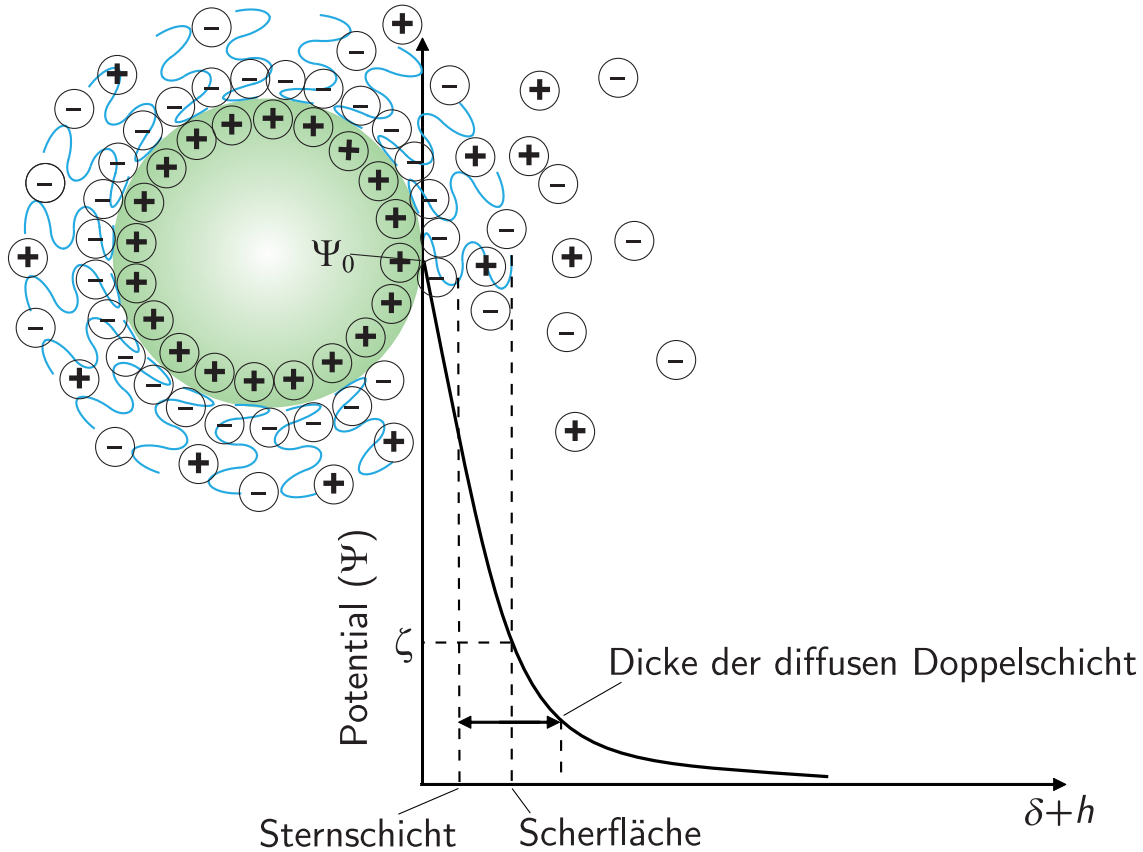
Im Rahmen dieser Studie wurden Gold-Nanopartikel hergestellt und kolloidchemisch charakterisiert. Die Anbindung von polyklonalen IgG-Antikörpern wurde durch Adsorption oder durch Kopplung mit 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid durchgeführt. Die Wechselwirkungen von Gold-Nanopartikeln mit Rinderserumalbumin (BSA) und Antikörpern wurden kolloidchemisch und mittels Agarose-Gelelektrophorese untersucht.

### 2.4 Stabilität von Nanopartikeln in wässriger Dispersion

Die kolloidale Stabilität von wässrigen Nanopartikeldispersionen ist im Wesentlichen durch anziehende van-der-Waals-Kräfte (Londonsche Dispersionskräfte) zwischen den Nanopartikeln als fein verteilter diskontinuierlicher Phase im polaren Dispersionsmittel Wasser (kontinuierliche Phase) begrenzt. Diese anziehenden Kräfte stehen im Wechselspiel mit den repulsiven elektrostatischen und/oder sterischen Kräften, welche durch Liganden oder Oberflächenladungen der Nanopartikel induziert werden.

In wässrigen Elektrolyten kondensieren an geladenen Grenzflächen je nach Ionenstärke mehr oder weniger stark Ladungsträger entgegengesetzter Ladung. Es bildet sich ein Grenzflächenpotential aus. Durch die Phasengrenze fest-flüssig können die Ladungsträger nicht in einer Ebene vorliegen, so dass sich eine elektrische Doppelschicht entgegengesetzt geladener Ladungsträger ausbildet. Diese Doppelschicht ist in realen Nanopartikeldispersionen in der Regel nicht starr. Das heißt, dass die Ladungsträger nicht fest adsorbiert sind und die Änderung des Potentials mit dem Abstand nicht linear verläuft. In nicht zu starken Elektrolyten und an nicht zu stark geladenen Oberflächen lässt sich die Änderung des Grenzflächenpotentials mit einem kombinierten Modell aus einer starren und einer diffusen Doppelschicht beschreiben (Sternschicht). Hierbei fällt das Potential in unmittelbarer Nähe der Grenzfläche durch akkumulierte Ladungsträger entgegengesetzter Ladung linear ab und nähert sich schließlich exponentiell dem Wert Null (Abb. 2.4).<sup>[233]</sup>

Die Dicke der diffusen Doppelschicht hängt von der Art des Elektrolyten, dem Nernstpotential der Partikeloberfläche ( $\psi_0$ ) und adsorbierten Polymermolekülen an der Partikeloberfläche ab. Bei der thermischen Bewegung von Nanopartikeln in Dispersion verbleibt eine dünne Schicht von Molekülen der kontinuierlichen Phase und gelösten Ionen in Ruhe und erfährt keine Translation relativ zur Partikeloberfläche. Im größeren Abstand zur Oberfläche des Nanopartikels bildet sich eine Scherfläche innerhalb der diffusen Doppelschicht zum umgebenden Elektrolyten aus. Das Potential an dieser hydrodynamischen Scherfläche wird als Zetapotential ( $\zeta$ ) bezeichnet. Das Zetapotential lässt sich mit der Dynamischen Lichtstreuung (DLS) messen und gibt Aufschluss über die Ladung von Nanopartikeln in wässriger Dispersion.



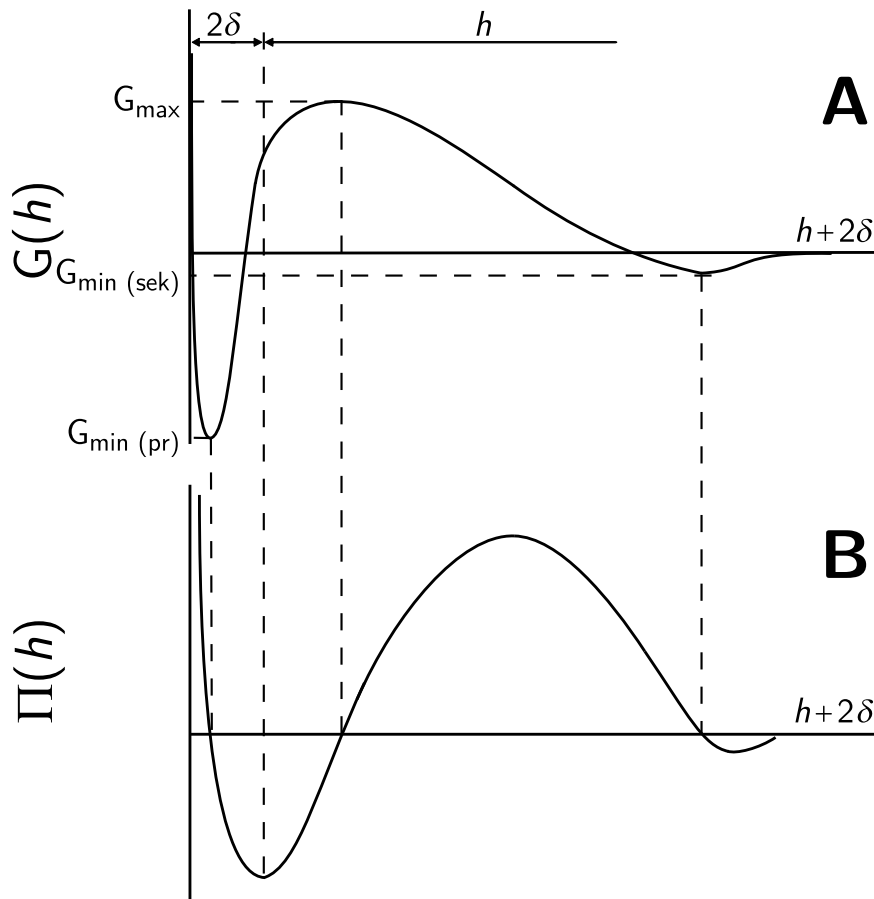
**Abb. 2.4:** Schematische Darstellung zur Definition des Zetapotentials ( $\zeta$ ). An der Nanopartikeloberfläche kondensieren Ladungsträger entgegengesetzter Ladung. Der Verlauf des Potentials ( $\psi$ ) ist als Funktion des Abstands ( $\delta + h$ ) angegeben.

Die Wechselwirkungen von Nanopartikeln in Dispersion, die mit Polyelektrolyten funktionalisiert sind, lassen sich mit der erweiterten DLVO-Theorie beschreiben.<sup>[234,235]</sup> Die erweiterte DLVO-Theorie kombiniert die attraktiven van-der-Waals Kräfte mit den repulsiven elektrostatischen Kräften der Doppelschicht und berücksichtigt den Einfluss gelöster Salze.<sup>[236,237]</sup> Die gesamte Gibbs-Energie ( $G_{T,el}$ ) eines rein elektrostatisch stabilisierten kolloidalen Systems lässt sich in drei Terme zerlegen.

Neben dem repulsiven elektrostatischen Anteil ( $G_{el}$ ) und dem attraktiven Anteil der van-der-Waals-Anziehung ( $G_A$ ) wirkt sich auch die Art und Zusammensetzung des Dispersionsmittels aus. Der Einfluss des Dispersionsmittels, gelöster Salze und der Solvation der Partikeloberfläche wird durch repulsive Hydratationskräfte<sup>[238–242]</sup> zusammengefasst und liefert einen Beitrag ( $G_{solv, str}$ ) zur gesamten Gibbs-Energie (Gleichung 2.1).<sup>[242]</sup>

$$G_T = G_A + G_{el} + G_{solv, str} \quad (2.1)$$

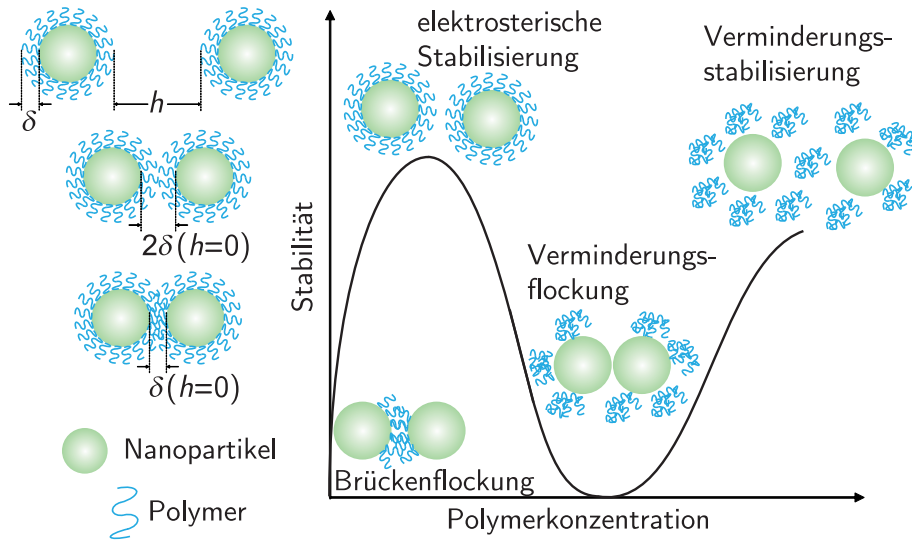
Der Verlauf der Gibbs-Energie ( $G$ ) für die Wechselwirkung zwischen kolloidalen Partikeln unter Vernachlässigung des sterischen Anteils der Abstoßung lässt sich als Funktion des Abstandes  $h$  angeben (Abb. 2.5). Der Spaltdruck  $\Pi$  (engl. *disjoining pressure*) zwischen zwei Nanopartikeln lässt sich auch als Funktion des Abstands  $h$  definieren. Die Funktion entspricht der ersten Ableitung der Energiefunktion. Der Betrag des Spaltdrucks ist an drei Stellen der Funktion gleich Null.



**Abb. 2.5:** Verlauf der Gibbs-Energie als Funktion des Abstandes  $2\delta + h$  zwischen zwei Nanopartikeln (A). Der Verlauf des Spaltdrucks  $\Pi$  als Funktion des Abstandes  $2\delta + h$  zwischen den Oberflächen der Nanopartikel zeigt drei Nullstellen an den Extrema der Energiefunktion  $G(h)$  (B). Oberhalb der Abszisse erfahren die Partikel eine repulsive, unterhalb der Abszisse eine attraktive Kraft. <sup>[242]</sup>

Nähern sich zwei Partikel mit dem Abstand  $h \rightarrow \infty$  an, so durchläuft die Gibbs-Energie zunächst ein Minimum (sekundäres Minimum,  $G_{\text{sek}}$ ). In Dispersionen wird unter diesen Bedingungen oftmals eine reversible Flockung beobachtet.<sup>[243]</sup> Nähern sich Partikel weiter an, so durchläuft die Gibbs-Energie ein Maximum ( $G_{\text{max}}$ ) an der zweiten Nullstelle von  $\Pi(h)$ . Der Zustand bei  $G_{\text{max}}$  wird in realen Dispersionen jedoch nicht beobachtet, da der Spaltdruck gleich Null ist. Eine leichte Verschiebung zu größeren Abständen führt zu einem repulsiven Spaltdruck. Im primären Minimum ( $G_{\text{pr}}$ ) der Energiefunktion erfahren die Nanopartikel eine (irreversible) Flockung und koagulieren zu größeren Partikeln. Nähern sich die Nanopartikel weiter an, so steigt die Energiefunktion stark an. Die repulsiven elektrostatischen Kräfte und Dispersionsmittelkräfte sorgen für eine Energiebarriere zwischen den Nanopartikeln. Wird diese Energiebarriere überwunden, so kann das erste Minimum der Energiefunktion erreicht werden, in dem irreversible Flockung eintritt.<sup>[242,244]</sup>

Ausgedehnte Polyelektrolyte großen Molekulargewichts zeigen darüber hinaus einen sterischen Einfluss, der von der DLVO-Theorie nicht berücksichtigt wird. In Abbildung 2.6 ist schematisch der Abstand  $h$  zwischen zwei sterisch stabilisierten Nanopartikeln dargestellt. Der Energiebeitrag durch sterische Wechselwirkungen lässt sich auch als Funktion des Abstands  $h$  angeben. Je nach Bedeckungsgrad des Polymers, Ionenstärke des Elektrolyten und Beiträgen der jeweiligen repulsiven und attraktiven Kräfte kann es in einer Nanopartikeldispersion in Abhängigkeit von Temperatur und Zeit zu Entmischung und Phasenseparation kommen. Die Stabilität von kolloidalen Dispersionen hängt auch stark von der Konzentration des Polyelektrolyten ab. Abbildung 2.6 zeigt schematisch die Stabilisierung und Flockung einer kolloidalen Dispersion als Funktion der Polyelektrolytkonzentration. Beim Überlappen der Polyelektrolythüllen der Dicke  $\delta$  ist das chemische Potential des Dispersionsmittels im Volumenanteil des Überlappungsbereichs reduziert. Der osmotische Druck ist lokal erhöht. Das Dispersionsmittel diffundiert in den Überlappungsbereich, so dass eine starke repulsive Kraft die Partikel separiert. Ist die Polyelektrolytkonzentration gering, kann es zur Brückenflockung kommen, wobei an einem Nanopartikel adsorbierte Polyelektrolytmoleküle an freien Oberflächenplätzen weiterer Nanopartikel adsorbieren können. Bei ausreichender Polyelektrolytkonzentration können Nanopartikel durch den Polyelektrolyten stabilisiert werden, so dass Aggregation und Koagulation verhindert werden können. Bei weiterer Erhöhung der Polyelektrolytkonzentration kann eine Verminderungsflockung oder auch eine Verminderungsstabilisierung eintreten. Hier sind nicht alle Oberflächenplätze der Partikeloberfläche mit Polyelektrolytmolekülen belegt. So kann es zur Flockung oder Separation der Nanopartikel durch gelöste freie Polyelektrolytmoleküle kommen. In wässrigen Dispersionen bewirkt das Überlappen von Adsorptionsschichten an den Nanopartikeln eine Verminderung der Konzentration an Wassermolekülen und damit



**Abb. 2.6:** Schematische Darstellung von Polyelektrolyt-stabilisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln im Abstand  $h$ . Die Dicke der stabilisierenden Polyelektrolyt-Hülle ist mit  $\delta$  angegeben.

eine Enthalpie- und Entropieänderung.

Eine genauere und semi-quantitative Beschreibung liefert die Flory-Huggins-Theorie.<sup>[245]</sup> Die Änderung der Gibbs-Mischungsenergie ( $G_{\text{mix}}$ ) des Systems lässt sich durch den Flory-Huggins-Wechselwirkungsparameter  $\chi$  nach Gleichung 2.2 beschreiben.<sup>[245–250]</sup>

$$\frac{\Delta G_{\text{mix}}}{k_B T} = \left( \frac{2V_2^2}{V_1} \right) \nu_2^2 \left( \frac{1}{2} - \chi \right) \left( \delta - \frac{h}{2} \right)^2 \left( 3r + 2\delta + \frac{h}{2} \right) \quad (2.2)$$

$k_B$  ist die Boltzmann-Konstante,  $T$  die absolute Temperatur,  $V_1$  ist das molare Volumen des Dispersionsmittels,  $V_2$  ist das molare Volumen des Polyelektrolyten,  $\nu_2$  ist die Anzahl der Polyelektrolytmoleküle pro Partikeloberfläche,  $h$  ist der Abstand zwischen den Nanopartikeln,  $r$  ist der Durchmesser des Kerns eines Nanopartikels,  $\delta$  ist die Dicke der Polyelektrolythülle.

Der Flory-Huggins-Wechselwirkungsparameter  $\chi$  ist dabei über die Beziehung in Gleichung 2.3 mit den Parametern  $\varphi$  und  $\kappa$  verknüpft, welche Enthalpie- und Entropiebeiträge des Flory-Huggins-Wechselwirkungsparameters liefern.

$$(\kappa - \varphi) = \left( \frac{1}{2} - \chi \right) \quad (2.3)$$

Die gesamte Gibbs-Energie ( $G_{\text{T, ster}}$ ) der Wechselwirkung zweier rein sterisch stabilisierter

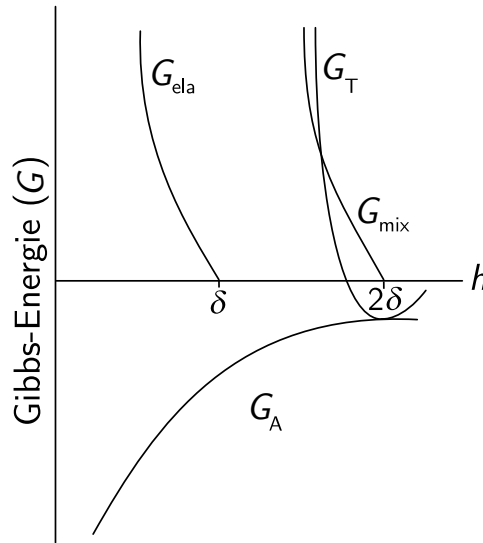


Nanopartikel unter Berücksichtigung des sterischen Anteils der Abstoßung durch ausge dehnte Polyelektrolyten, setzt sich aus dem attraktiven Anteil der Gesamtenergie ( $G_A$ ) und dem sterischen Anteil der Abstoßung ( $G_S$ ), sofern keine zusätzlichen elektrostatischen Kräfte wirken, nach folgender Beziehung zusammen (Gleichung 2.4):

$$G_T = \underbrace{G_{\text{mix}} + G_{\text{ela}}}_{G_S} + G_A \quad (2.4)$$

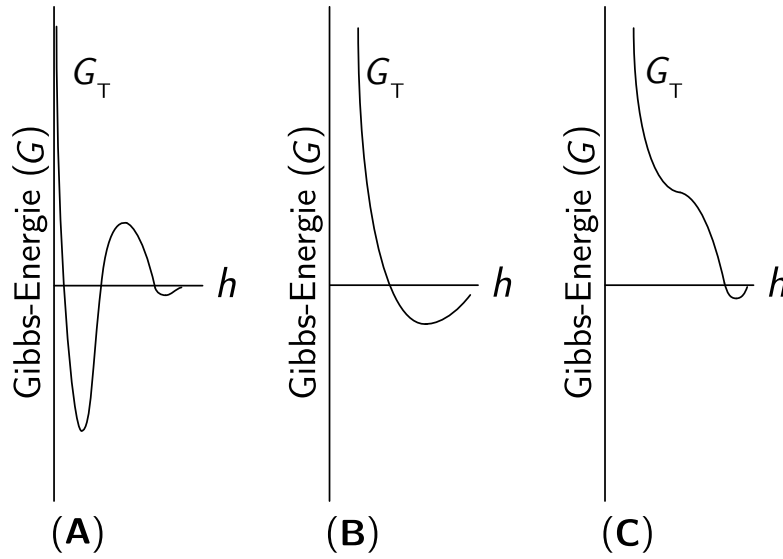
$$G_S = G_{\text{mix}} + G_{\text{ela}} \quad (2.5)$$

Die Gibbs-Mischungsenergie  $G_{\text{mix}}$  liefert den Beitrag überlappender Polymerhüllen der Dicke  $\delta$  als Funktion des Abstandes  $h$  zwischen zwei Nanopartikeln (Abbildung 2.6).<sup>[243]</sup> Die Summe aus elastischem Anteil und der Gibbs-Mischungsenergie liefert die Energie der sterischen Abstoßung  $G_S$  (Gleichung 2.5).<sup>[242,251]</sup>



**Abb. 2.7:** Schematische Darstellung des Abstandes zwischen Polymer-stabilisierten Nanopartikeln.  $h$  Abstand zwischen zwei Nanopartikeln;  $\delta$  Dicke der Polymer-schicht.<sup>[242]</sup>

In Polyelektrolyt-stabilisierten Nanopartikel-Dispersionen wirken neben attraktiven van-der-Waals-Kräften sowohl repulsive elektrostatische als auch sterische Kräfte. Die Gewich-tung der Kräfte bei der Modellierung realer Systeme ist komplex und die Berechnung der Gesamtenergien hängt von einer Vielzahl von Parametern ab. In Abbildung 2.8 ist zu-sammenfassend der qualitative Verlauf eines rein elektrostatisch stabilisierten kolloidalen Systems (**A**), eines rein sterisch stabilisierten kolloidalen Systems (**B**) und eines elektros-



**Abb. 2.8:** Qualitative Darstellung der gesamten Gibbs-Energie eines rein elektrostatisch stabilisierten Kolloids **(A)**, eines rein sterisch stabilisierten Kolloids **(B)** und eines elektrosterisch stabilisierten Kolloids **(C)**.<sup>[244]</sup>

terisch stabilisierten kolloidalen Systems **(C)** gezeigt.<sup>[244]</sup>

Die Gesamtenergie eines elektrosterisch stabilisierten Kolloids lässt sich durch Kombination der DLVO-Theorie mit dem Modell der sterischen Stabilisierung nach Gleichung 2.6 beschreiben.<sup>[249,250]</sup>

$$G_T = \underbrace{G_A + G_{el} + G_{solv, str}}_{G_{T, el}} + \underbrace{G_{mix} + G_{ela}}_{G_S} \quad (2.6)$$

Die Wechselwirkungen zwischen Polyelektrolyt-stabilisierten Nanopartikeln lassen sich mit den theoretischen Modellen nur unzureichend erklären. Insbesondere die Wechselwirkungen mit biologischen Systemen in wässriger Dispersion mit einer Vielzahl an organischen Molekülen und unterschiedlich valenten Ionen lassen sich mit den bekannten Theorien nicht beschreiben.<sup>[57]</sup> Diese offenen Systeme befinden sich nicht im thermodynamischen Gleichgewicht und unterliegen einer ständigen Dynamik. Die Wechselwirkungen von Polyelektrolyten in Gegenwart von unterschiedlich valenten Ionen spielen bei Ionenstärken  $> 0,1 \text{ mol L}^{-1}$  eine große Rolle und beeinflussen die elektrosterische Abstoßung der Nanopartikel untereinander.<sup>[252–254]</sup>

Die in dieser Studie synthetisierten Nanopartikel-Dispersionen wurden kolloidchemisch hinsichtlich ihrer Ladung, Dispersität und Stabilität in Reinstwasser und biologischen

Medien untersucht.

## 2.5 Polyelektrolyte zur Stabilisierung von Calciumphosphat-Nanopartikeln

Unter dem Begriff Polyelektrolyte werden organische Makromoleküle zusammengefasst, deren funktionelle Gruppen in Lösung ionisch vorliegen. Gegenüber starken Polyelektrolyten, wie Polystyrensulfonat oder Polydiallyldimethylammoniumchlorid, welche über einen weiten pH-Bereich geladen vorliegen und eine lineare („*worm-like*“) Konformation in verdünnter Lösung annehmen, ist die Konformation von schwächeren Polyelektrolyten, wie Carboxymethylcellulose oder Polyethylenimin, in verdünnter Lösung komplexer.<sup>[255]</sup> Ein schwaches Polyanion, wie Carboxymethylcellulose, liegt in wässriger Lösung als gestrecktes partiell geknäultes Polymer vor. Bei  $pH \geq 7$  liegt Carboxymethylcellulose vollständig deprotoniert vor.<sup>[256]</sup> Chondroitinsulfat ist aufgrund der Sulfonatfunktionen stärker gestreckt.<sup>[254,257]</sup>

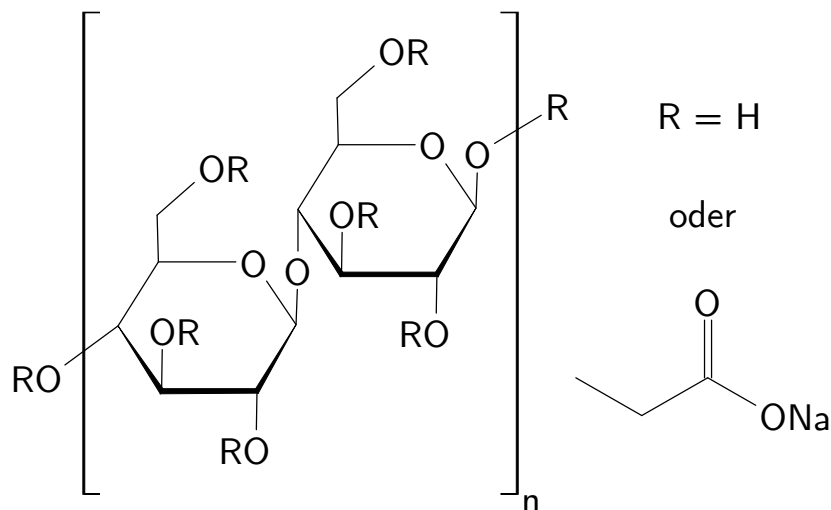
In dieser Arbeit wurden Calciumphosphat-Nanopartikel mit den Polyanionen Carboxymethylcellulose und Chondroitinsulfat stabilisiert. Der Einfluss auf die osteogene, adipogene und chondrogene Differenzierung von humanen mesenchymalen Stammzellen wurde *in vitro* untersucht.

### 2.5.1 Carboxymethylcellulose

Carboxymethylcellulosen (CMC) gehören zu den wichtigsten, technisch eingesetzten Polyelektrolyten biogenen Ursprungs.<sup>[258]</sup> Celluloseether werden aus den Hölzern von Laub- und Nadelbäumen extrahiert, technisch carboxymethyliert und finden Anwendung in Waschmitteln, als Lebensmittelzusatzstoffe und in Arzneimitteln.<sup>[259]</sup> Die jährliche Produktion und der Verbrauch an Carboxymethylcellulosen wird auf mehrere hunderttausend Tonnen allein in Deutschland geschätzt.<sup>[258,260,261]</sup>

Carboxymethylcellulose ist ein biokompatibler Celluloseether, bei dem die D-Glukoseeinheiten  $\beta$ -1→4-glykosidisch miteinander verknüpft sind (Abbildung 2.9).

Es gibt verschiedene Substitutionsgrade, wobei Carboxymethylcellulosen mit Substitutionsgraden  $> 0,6$  bis zur maximalen Substitution von 3 leicht wasserlöslich sind. Die Säureformen sind in Wasser grundsätzlich schwer löslich. Natriumsalze der Carboxymethylcellulosen (NaCMC) lassen sich je nach Substitutionsgrad gut in Wasser lösen.



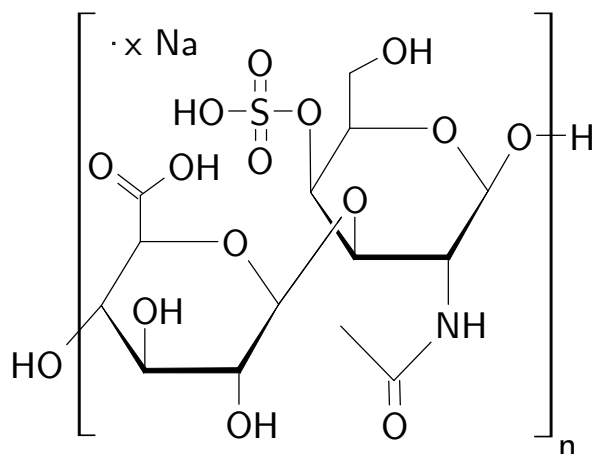
**Abb. 2.9:** Struktur des Polyelektrolyten Carboxymethylcellulose (Natriumsalz). Die D-Glukoseeinheiten sind  $\beta$ -1 $\rightarrow$ 4-glykosidisch miteinander verknüpft. R bezeichnet mögliche Substitutionsstellen für Carboxymethylfunktionen.

Carboxylgruppen von CMC lassen sich mit Fluoreszenzfarbstoffen oder heterofunktionellen Molekülen über Peptidbindungen zu Konjugaten umsetzen (Abschnitt 2.6).

### 2.5.2 Chondroitinsulfat

Chondroitinsulfate (CS) sind als sulfatierte Glukosaminoglykane aus sich wiederholenden Disaccharideinheiten aufgebaut. Die Carboxyl- und Alkylsulfatfunktionen verleihen den Polysacchariden einen sauren Charakter. Die Konformation von Polysacchariden hängt maßgeblich von der Ladung der Monomereinheiten ab. Deprotonierte Carboxyl- und Alkylsulfatfunktionen sorgen für eine große negative Ladungsdichte mit 100 negativen Ladungen entlang der Polymerkette.<sup>[262]</sup> Die Struktur von Natrium-Chondroitin-4-sulfat ist in Abbildung 2.10 dargestellt.

Bei niedriger Ionenstärke liegen die Moleküle linear gestreckt in Lösung vor („*worm-like chain*“). In physiologischer Umgebung spielen kondensierte Gegenionen eine große Rolle und die Struktur von Chondroitinsulfat ist weitaus komplexer.<sup>[254]</sup> Chondroitinsulfat ist ein wesentlicher Bestandteil des Knorpelgewebes.<sup>[263]</sup> Chondroitinsulfat und andere Glukosaminoglykane sind an Proteine gebunden. Die sich ergebende Einheit aus vielen linearen Polysaccharid-Ketten, welche an lineare Kernprotein gebunden sind, werden Proteoglykane genannt.<sup>[264]</sup> Proteoglykane bilden in der extrazellulären Matrix und an den Zellmembranen ein stabilisierendes und strukturgebendes Geflecht aus.<sup>[263–265]</sup> Chondroitin-4-sulfat findet sich vornehmlich während der Differenzierung von Chondrozyten in wachsendem



**Abb. 2.10:** Struktur von Chondroitin-4-sulfat (Natriumsalz). Carboxyl- und Sulfonatfunktionen verleihen dem Polyelektrolyten einen anionischen Charakter.

Knorpelgewebe. Chondroitin-6-sulfat macht den Großteil des Chondroitinsulfats in differenziertem älteren Gewebe aus.<sup>[266]</sup>

Proteoglykane vermindern die Zelladhesion an Fibronectin und Kollagen. Die verminderte Zelladhesion spielt eine wichtige Rolle bei der chondrogenen Differenzierung.<sup>[264]</sup>

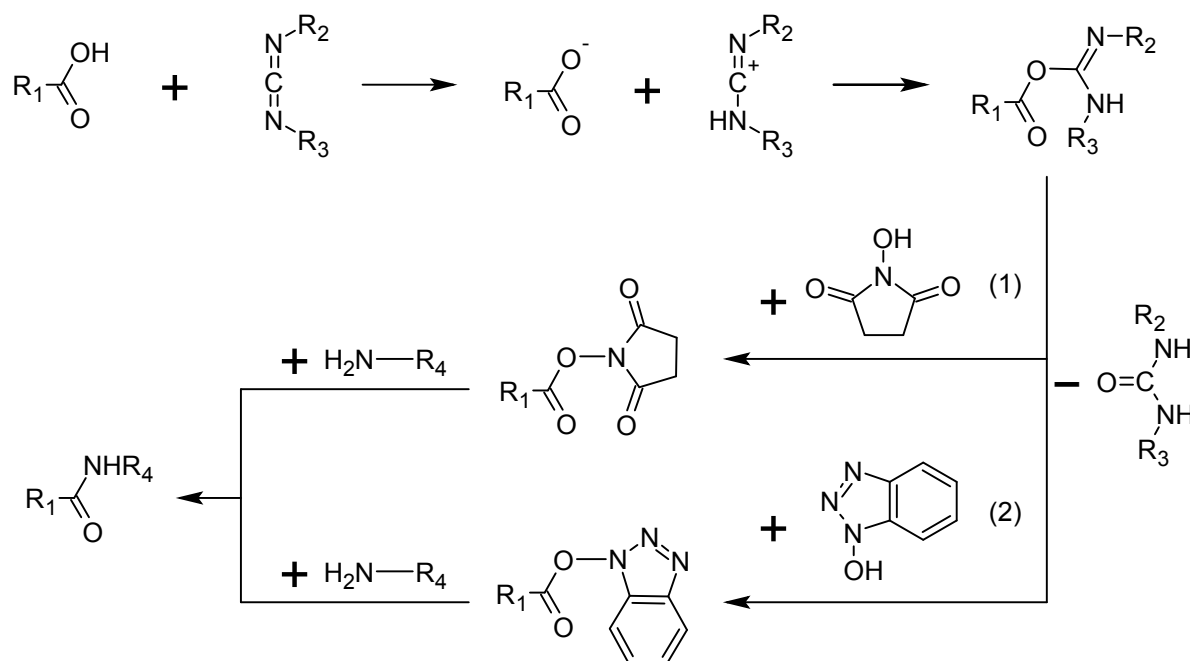
Chondroitin-4-sulfat- und Chondroitin-6-sulfat- reiche Proteoglykane zeigen eine verminderte Neigung zur Mineralisation.<sup>[267]</sup> Chondroitinsulfat zeigt darüber hinaus eine entzündungshemmende Wirkung durch eine starke Affinität gegenüber Chemokinen wie dem Chemokin CXCL4 (Platelet factor 4, PF-4).<sup>[268,269]</sup>

## 2.6 Darstellung von Carbonsäureamiden in wässrigen Lösemitteln

Carbonsäureamide lassen sich in wässriger Lösung durch Aktivierung der Carboxylgruppen mit Carbodiimiden erhalten.<sup>[270–273]</sup> Das 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC) eignet sich durch seine gute Wasserlöslichkeit für Kopplungen in Wasser und Wasser-Ethanol-Gemischen.<sup>[274–277]</sup>

Die Reaktion von Carbodiimiden mit Carboxylgruppen verläuft in saurer Lösung wesentlich schneller als in neutraler oder basischer Lösung.<sup>[274,275]</sup> Im Säuren werden Carbodiimide rasch protoniert und in Carbokationen umgesetzt. Diese sind ausreichend elektrophil, um an deprotonierte Carboxylgruppen zu addieren. Die Carbokationen hydrolysieren in wässriger Lösung, so dass die Reaktion mit Wasser zu den entsprechenden Harnstoffderivaten eine der wichtigsten Nebenreaktionen darstellt. Carboxylgruppen werden durch das elektrophile Carbodiimid in reaktive *O*-Acylisoharnstoffe (Aktivester) umgesetzt.<sup>[274,275]</sup>

Nukleophile wie primäre Amine können mit diesen Aktivestern reagieren und zu Carbonsäureamiden umgesetzt werden, wobei die entsprechenden Harnstoffderivate abgespalten werden.<sup>[274–278]</sup>



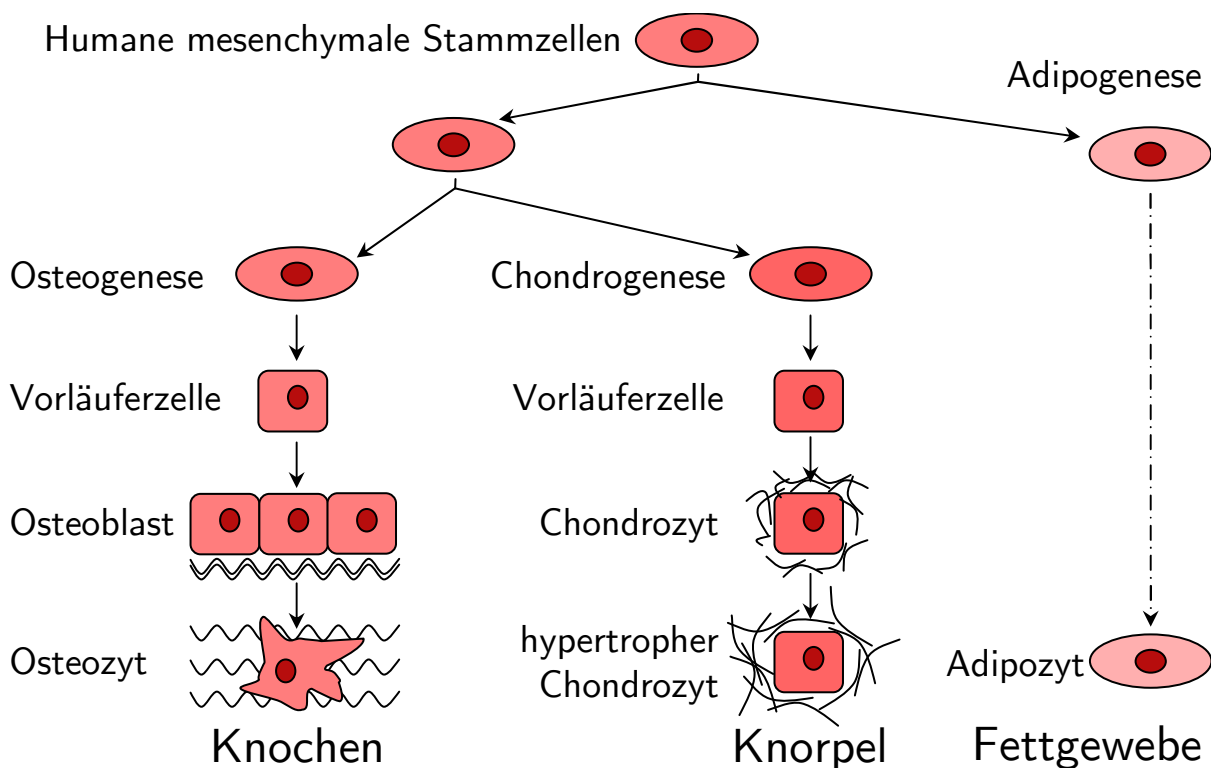
**Abb. 2.11:** Reaktionsmechanismus der Carbonsäureamidbildung. Aktivierung der Carboxylfunktion durch ein Carbodiimid unter Bildung eines *O*-Acylisoharnstoffs, Angriff des nukleophilen *N*-Hydroxysuccinimids (NHS, **1**) oder 1-Hydroxybenzotriazols (HOBt, **2**) unter Bildung der entsprechenden Aktivester, welche mit primären Aminen zu Carbonsäureamiden umgesetzt werden können. R bezeichnet organische Reste.

*O*-Acylisoharnstoffe hydrolysieren in wässriger Lösung schnell zu unreaktiven *N*-Acylharnstoffen. Um das Gleichgewicht in Richtung der gewünschten Carbonsäureamide zu verschieben, lassen sich *O*-Acylisoharnstoffe mit *N*-Hydroxysuccinimid (NHS) oder 1-Hydroxybenzotriazol (HOBt) in hydrolysestabilere Aktivester umsetzen, wobei das entsprechende Harnstoffderivat des Carbodiimids abgespalten wird.<sup>[274,276,279,280]</sup>

Die Aktivester reagieren rasch unter Rückbildung des *N*-Hydroxysuccinimids oder 1-Hydroxybenzotriazols mit primären Aminen zu Carbonsäureamiden. Die Reaktion der Aktivester mit primären Aminen wird in der Regel in Gegenwart einer Base in schwach alkalischer Lösung durchgeführt.<sup>[281]</sup> Das Schema der Carbonsäureamidbildung mit NHS und HOBt ist in Abbildung 2.11 gezeigt.<sup>[232,277,278]</sup>

## 2.7 Differenzierung von humanen mesenchymalen Stammzellen

Adulte humane mesenchymale Stammzellen (hMSCs) übernehmen als multipotente Zellen des Bindegewebes eine wichtige Funktion bei der Regeneration des gesamten Stütz- und Bindegewebes. Sie besitzen die Fähigkeit, sich in alle Arten des Stütz- (Knochengewebe, Knorpelgewebe) und des Bindegewebes zu differenzieren.<sup>[263,282,283]</sup> In Abbildung 2.12 ist ein vereinfachtes Schema einiger Differenzierungszweige mesenchymaler Stammzellen zu Knochen-, Knorpel- und Fettgeweben gezeigt. Für *in vitro* Studien werden hMSCs in der Regel aus dem Knochenmark von freiwilligen Spendern gewonnen und als Zelllinie kultiviert.<sup>[284]</sup>



**Abb. 2.12:** Stark vereinfachter schematischer Ablauf der Differenzierung von humanen mesenchymalen Stammzellen. Neben den hier gezeigten Wegen der Differenzierung können hMSCs zu anderen Bindegewebs- und Muskelzellen differenzieren.<sup>[285]</sup>

Die Differenzierung von hMSCs wird *in vivo* durch eine Vielzahl von Stimuli ausgelöst. Die physiologische Regeneration des Knochens im Rahmen des stetigen Auf- und Abbaus des Knochenmaterials setzt ebenfalls die Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen voraus. Gesunder Knochen unterliegt einem stetigen Erneuerungsprozess.<sup>[263,286]</sup> Dabei wird der Knochen von knochenabbauenden Osteoklasten abgebaut und von knochenauf-

bauenden Osteoblasten durch neuen Knochen ersetzt. Im gesunden Knochen werden in erster Linie externe mechanische Stimuli mit der Aktivität von Osteoblasten und Osteoklasten in Verbindung gebracht.<sup>[287]</sup>

Weitere Stimuli sind Verletzungen des intakten Gewebes, zu denen auch der chirurgische Einsatz eines Implantates zu zählen ist. Erkranktes oder verletztes Knochengewebe verursacht eine Entzündungsreaktion am Ort der Erkrankung oder Verletzung, wie etwa einer Fraktur. Das beschädigte Gewebe setzt dabei bioaktive Substanzen, u.a. Wachstumsfaktoren wie knochenmorphogenetische Proteine (BMPs) und transformierende Wachstumsfaktoren des Typs  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) frei. Sie bewirken die Chemotaxis von hMSCs in das entzündete Gewebe.<sup>[286]</sup>

hMSCs kommen dort einerseits sekretorische Funktionen, in Form der Produktion von Zytokinen und Antioxidanzien, zu. Andererseits differenzieren sie zu Zellen des Binde- und Stützgewebes.<sup>[288]</sup> Je nach Stabilität der Fraktur differenzieren hMSCs zu Chondrozyten oder Osteoblasten. Instabile Frakturen werden zunächst mit Knorpelgewebe überbrückt, welches durch Knochen ersetzt wird. An der Fraktur bildet sich eine Verdickung, ein sogenannter Kallus aus (indirekte Frakturheilung).<sup>[289]</sup> Bei stabilen Frakturen differenzieren hMSCs zu Osteoblasten und reparieren das verletzte Knochengewebe direkt (direkte Frakturheilung).<sup>[286,290,291]</sup> Dabei zeigen hMSCs eine immunmodulierende Funktion, indem sie die Freisetzung von Zytokinen aus dendritischen Zellen steuern. Auf diese Weise zeigen hMSCs eine antiinflammatorische Wirkung durch Herabregulation der Aktivität von T-Zellen.<sup>[290,292,293]</sup>

Im Hinblick auf die klinische Rekonstruktion von erkranktem oder verletztem Stützgewebe kommt der Wechselwirkung eines Biomaterials und mesenchymalen Stammzellen und deren nachfolgenden differenzierteren Zellen, wie Osteoprogenitorzellen, eine wichtige Funktion zu, die oftmals über den Erfolg der Knochenneubildung oder die Integration eines Implantates entscheiden kann.<sup>[294]</sup>

Das Regenerationsvermögen von Knorpelgeweben ist beschränkt und unterliegt keinem stetigen Erneuerungsprozess.<sup>[295]</sup> Der Differenzierung von hMSCs (*in vitro*) oder direkt am Ort des Defekts (*in vivo*) wird ein erhebliches Potenzial für einen therapeutischen Ansatz zur Rekonstruktion von defektem Knorpelgewebe zugesprochen (*tissue engineering*).<sup>[296,297]</sup> Im Hinblick auf die künstliche Rekonstruktion von Knochen- und Knorpelgeweben werden nanopartikuläre Systeme als vielversprechende therapeutische Methode zur Förderung der Knochen- oder Knorpelneubildung angesehen.<sup>[298]</sup>

In dieser Studie wurde die osteogene, chondrogene und adipogene Differenzierung von hMSCs nach der Inkubation mit Calciumphosphat-Nanopartikeln, stabilisiert durch die Polyelektrolyten CMC und CS, untersucht.



## 3 Materialien und Methoden

### 3.1 Rasterelektronenmikroskopie

Als mikroskopische Technik eignet sich die Rasterelektronenmikroskopie (REM) dazu, Strukturen abzubilden, deren Dimensionen kleiner sind als die halbe Wellenlänge des sichtbaren Lichts und so mit lichtmikroskopischen Techniken aufgrund des Abbe'schen Beugungslimits ( $d = \frac{\lambda}{2n\sin\alpha}$ ) nicht abgebildet werden können. Bei der Rasterelektronenmikroskopie rastert ein durch magnetische Linsen fein fokussierter Elektronenstrahl als Sonde die Oberfläche der Probe ab. Neben rückgestreuten hochenergetischen Elektronen können auch niederenergetische Sekundärelektronen detektiert werden. Diese Sekundärelektronen stammen aus der Probenoberfläche und geben Aufschluss über die Topographie und die Materialeigenschaften der Probe. Durch Anlegen eines geeigneten elektromagnetischen Feldes können Sekundärelektronen und Rückstreuелеktronen getrennt detektiert werden. Alle rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden mit einem ESEM Quanta 400 FEG (FEI) durchgeführt. Die Proben wurden als wässrige Dispersion, sofern nicht anders beschrieben, auf mit Aceton gereinigten Silizium-Wafern aufgetragen und an Luft getrocknet. Alle Proben wurden mit einer dünnen Schicht ( $< 2$  nm) einer Gold-Palladium-Legierung (Au:Pd = 20:80) bedampft.

### 3.2 Energie-dispersive Röntgenspektroskopie

Für die qualitative und semi-quantitative Analyse der elementaren Bestandteile von Festkörpern eignet sich die Energie-dispersive Röntgenspektroskopie (EDX). Durch einen hochenergetischen Elektronenstrahl können Elektronen in einem Festkörper angeregt werden und ihren stationären Zustand in einem Atom verlassen. Der entstehende unbesetzte Energiezustand wird sofort mit einem Elektron höherer potentieller Energie des selben Atoms besetzt. Die für den Übergang spezifische Energiedifferenz kann als Röntgenquant emittiert und detektiert werden. Sie gibt Aufschluss über das vorliegende Element. Detektierbar sind alle Elemente mit einer Ordnungszahl  $> 4$ , wobei die Empfindlichkeit mit steigender Ordnungszahl zunimmt. Die quantitative Bestimmung der elementaren Zusammensetzung der Proben wurde für die Elemente Calcium und Phosphor zur Berechnung des Calcium-

Phosphat-Verhältnisses durchgeführt.

Alle Untersuchungen wurden mit einem Genesis 4000 (EDAX), gekoppelt an ein ESEM Quanta 400m FEG (FEI), durchgeführt. Die Proben wurden als wässrige Dispersionen auf mit Aceton gereinigten Silizium-Wafern aufgetragen und an Luft getrocknet. Alle Proben wurden mit einer dünnen Schicht ( $<2$  nm) einer Gold-Palladium-Legierung (Au:Pd = 20:80) bedampft.

### 3.3 Transmissionselektronenmikroskopie

Bei der Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) werden Elektronen mit hoher kinetischer Energie als Sonde verwendet und eine dünne Schicht des Probenmaterials durchstrahlt. An der Probe werden die Elektronen je nach Zusammensetzung der Probe mehr oder weniger stark gestreut. Mit elektromagnetischen Linsen können gestreute Elektronen von den nichtgestreuten transmittierenden Elektronen abgetrennt werden, so dass am Detektor nur nichtgestreute Elektronen registriert werden. Diese liefern einen Kontrast, welcher proportional zur Ordnungszahl der in der Probe befindlichen Elemente ist. Schwere Elemente liefern einen starken, leichte Elemente einen schwachen Kontrast.

Alle Untersuchungen wurden mit einem CM 200 FEG (Philips) durchgeführt. Die Proben wurden durch Eintauchen eines Kupfer-Netzes in die wässrigen Nanopartikel-Dispersionen immobilisiert und an Luft getrocknet.

### 3.4 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie

Die konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM) eignet sich, um lichtmikroskopische Aufnahmen von Zellen oder Zellbestandteilen anzufertigen. Dabei werden nur solche Strukturen abgebildet, die mit Fluorophoren markiert sind. Als Sonde dienen mehrere Laser, wobei die Anregungswellenlänge durch den Einsatz von Filtern nicht detektiert wird. Es wird ausschließlich die emittierte Fluoreszenz der Fluorophore detektiert. Die Sonde rastert die Probe schrittweise ab, wobei gestreutes Fluoreszenzlicht außerhalb der Schärfebene durch eine Lochblende (engl. *pinhole*) abgeschirmt wird.

Untersuchungen an MG-63-Zellen wurden mit einem Leica SP5 inversen konfokalen CLSM durchgeführt. Die Zellen wurden in Kunststoffkammern auf Objektträgern (DB Falcon<sup>TM</sup> CultureSlides, DB Biosciences) kultiviert. Eine Stunde vor der Mikroskopie wurden die Zellmembranen mit CellMask Deep Red<sup>TM</sup> und die Zellkerne mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) angefärbt. Unmittelbar vor der Mikroskopie wurden die Zellen dreimal mit PBS-Puffer gewaschen, der Puffer abgesaugt, mit einem Mounting-Medium (Dako)

eingedeckt und mit Deckgläschen bedeckt. Die Deckgläschen wurden am Rand mit den Objektträgern mit klarem Nagellack verklebt. Die Proben wurden sofort mikroskopisch untersucht.

hMSCs wurden in Zellkulturkammern (Lab-Tek<sup>TM</sup>, Thermo Scientific) inkubiert. Die Endosomen und Lysosomen wurden mit *Lyso Tracker<sup>®</sup> Red DND-99* und die Zellkerne mit Hoechst 33342 angefärbt. Die Zellen wurden mit einem LSM 700 (Zeiss) mikroskopiert.

### 3.5 Scheibenzentrifugation

Die Scheibenzentrifugation (Differentielle zentrifugale Sedimentation, DCS) eignet sich zur Größenbestimmung von Nanopartikeln in Dispersion.<sup>[299]</sup> In einem Zuckergradienten sedimentieren die Nanopartikel entsprechend ihrer Dichte und Größe durch die Zentrifugalkraft in einer rotierenden Scheibe. Ein Detektor erfasst die Nanopartikel als Funktion der Zeit. Die modifizierte Stokes-Gleichung (Gleichung 3.1) liefert die Partikelgröße ( $d$ ) kugelförmiger Partikel bei ungestörter Sedimentation.

$$d = \sqrt{\frac{18\eta \ln(\frac{r_m}{r_0})}{(\rho_p - \rho_f)\omega^2 t}} \quad (3.1)$$

$\eta$  bezeichnet die dynamische Viskosität des Dispersionsmittels,  $\rho_f$  die Dichte des Dispersionsmittels,  $\rho_p$  die Dichte des Nanopartikels,  $\omega$  die Winkelgeschwindigkeit der rotierenden Scheibe,  $r_m$  die Messposition im Gradienten,  $r_0$  die Startposition des Nanopartikels im Gradienten und  $t$  die gemessene Zeit. Durch die Wahl eines monodispersen externen Standards lässt sich Gleichung 3.1 durch Ermittlung eines kombinierten Parameters  $K$  vereinfachen (Gleichung 3.2).  $K$  beschreibt alle Parameter aus Gleichung 3.1. Die Standardmessung wird unmittelbar vor der Probenmessung durchgeführt.<sup>[300,301]</sup>

$$d = K \sqrt{\frac{1}{t}} \quad (3.2)$$

Alle Messungen wurden mit einer Scheibenzentrifuge Modell DC 24000 (CPS Instruments) durchgeführt. Als externer Standard wurden Dispersionen mit monodispersen kugelförmigen PVC-Partikeln (CPS Instruments) mit Durchmessern von 371 und 377 nm verwendet.

## 3.6 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese ermöglicht die analytische und präparative Trennung von geladenen Makromolekülen und Nanopartikeln in einem elektrischen Feld. Die Agarose-Gelelektrophorese wird hauptsächlich zur Analyse der Länge von Nukleinsäuresequenzen verwendet. In einem gelierten Agarosegel bewegen sich dabei Ladungsträger entsprechend ihrer Ladung durch das Gel in Richtung der Elektroden. In der Regel wird ein horizontales Agarosegel verwendet, in dem Kammern für die Probelösungen ausgespart sind. Durch Anlegen eines elektrischen Feldes zwischen zwei parallelen Elektroden werden geladene Moleküle im Elektrolyten in Bewegung versetzt. Geladene Nanopartikel lassen sich in Agarosegelen hinsichtlich ihrer Ladung und Größe auftrennen. Die Migrationsstrecke im Gel lässt dabei qualitative Rückschlüsse auf die Größe und Ladung zu.<sup>[302–305]</sup>

Agarose-Gelelektrophoresen wurden in Gelen ( $12,4 \times 14,4 \text{ cm}^2$ , B×L) mit 0,5 % und 1 % Agarose (Sigma Aldrich) mit einem EV265 Netzteil (Consort) bei konstanter Spannung von 100 V und 0,07 A für 15 bis 60 Minuten durchgeführt. Als Elektrophoresepuffer wurde ein Tris-Acetat-EDTA-Puffer ( $2 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$  Tris(hydroxymethyl)-aminomethan,  $1 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$  Essigsäure,  $5 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  Dinatriumethyldiamintetraacetat, pH=8,5) verwendet. Die Nanopartikeldispersionen wurden unmittelbar vor der Elektrophorese mit dem Laufpuffer (30 % Saccharose in Puffer) zu einem resultierenden Saccharoseanteil von 5 % versetzt. Digitale Aufnahmen der Gele wurden mit einer Digitalkamera (DMC-TZ6, Panasonic) und einem Gel-Dokumentations-System (BioDoc-it®, Ultra-Violet Products Ltd) angefertigt. Die Aufnahmen wurden nachträglich mit der Bildbearbeitungssoftware Photoshop Elements 6 (Adobe) bearbeitet. Zur deutlicheren Visualisierung der Banden wurde der Kontrast und die Helligkeit der Aufnahmen erhöht.

## 3.7 UV/Vis-Spektroskopie

Die UV/Vis-Spektroskopie eignet sich als spektroskopisches Verfahren zur Ermittlung der Extinktion eines Stoffes oder Stoffgemisches im Wellenlängenbereich von 200 bis 800 nm. Die Extinktion  $E_\lambda$  (Gleichung 3.3) wird in Abhängigkeit von der Wellenlänge des eingestrahnten Lichts aufgezeichnet.  $I_0$  bezeichnet die Intensität des eingestrahnten Lichtes,  $I$  die Intensität des detektierten Lichtes,  $\epsilon$  den molaren Extinktionskoeffizienten,  $c$  die Stoffmengenkonzentration und  $d$  die Schichtdicke der Küvette. Für quantitative Untersuchungen werden Messungen an Verdünnungsreihen bekannter Konzentration durchgeführt und Kalibrationsgraden für die jeweiligen Systeme durch lineare Regression erstellt.

$$E_{\lambda} = \lg \frac{I_0}{I} = \epsilon \cdot c \cdot d \quad (3.3)$$

UV/Vis-spektroskopische Untersuchungen wurden mit einem Varian Cary Bio 300 Spektrometer durchgeführt. Die Proben wurden dazu in einer Quartzküvette vermessen. Der Einfluss der Quartzküvette und des Dispersions- bzw. Lösemittels auf die Extinktion wurde in Referenzmessungen mit reinem Dispersions- bzw. Lösemittel durchgeführt. Der Hintergrund wurde bei der Probenmessung automatisch abgezogen. Jede Messung wurde gegenüber einer Referenz mit ungestörtem Strahlengang vermessen (doppelter Strahlengang).

## 3.8 Gefriertrocknung

Die Gefriertrocknung (Sublimationstrocknung) wird zur schonenden Trocknung von wässrigen Lösungen oder Dispersionen durch Sublimation eingesetzt. Entsprechend der Dampfdruckkurve für Wasser können bei Drücken  $< 611$  Pa Wassermoleküle direkt aus der festen Phase in die Gasphase übergehen.

Die Calciumphosphat-Nanopartikel-Dispersionen wurden unmittelbar nach der Synthese und der Sterilfiltration in flüssigem Stickstoff eingefroren und gefriergetrocknet (Alpha 2-4 LSC, Martin Christ). Die Dispersionen wurden in 250 bis 500- $\mu$ L Aliquoten in Mikroschraubröhrchen (Sarstedt) abgedeckt mit einer gaspermeablen sterilen Membran (BREATHseal<sup>TM</sup>, BioGreinerOne) bei  $-7$  °C und 31 Pa gefriergetrocknet.

## 3.9 Dynamische Lichtstreuung

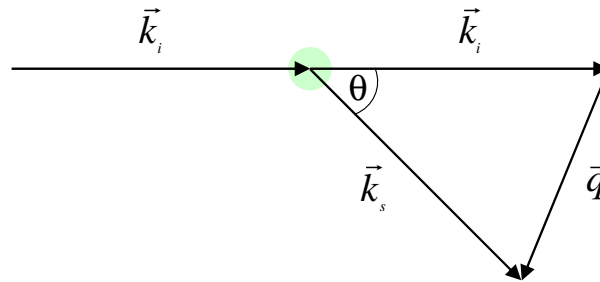
### 3.9.1 Größenbestimmung

Die Dynamische Lichtstreuung (DLS) ermöglicht die Größenbestimmung von Nanopartikeln in Dispersion durch Messung der Brown'schen Molekularbewegung. Ein Laserstrahl durchleuchtet die Dispersion in einer Messzelle. Das an den Nanopartikeln gestreute Licht wird an einem Detektor registriert. Die Fluktuation der Lichtintensität wird am Detektor zeitabhängig erfasst. Über die Stokes-Einstein-Gleichung lässt sich der hydrodynamische Durchmesser  $d_H$  von Partikeln in einer Dispersion ermitteln (Gleichung 3.4). Der Diffusionskoeffizient  $D$  lässt sich experimentell durch Messung eines Strömungskoeffizienten  $f$  (Gleichung 3.5) als Funktion der zeitlichen Fluktuation der Lichtintensität durch Korrelation mit einer exponentiell abklingenden Funktion berechnen.<sup>[306,307]</sup>

$$d_H = \frac{k_B T}{3\pi\eta D} \quad (3.4)$$

$$f = 3\pi\eta D \quad (3.5)$$

Das an einem Nanopartikel gestreute Licht lässt sich als sein Wellenvektor entsprechend Abbildung 3.1 beschreiben. Der Streuvektor  $\vec{q}$  ergibt sich als Linearkombination der Wellenvektoren des einfallenden  $\vec{k}_i$  und des gestreuten  $\vec{k}_s$  Lichts (Gleichung 3.6). Der Betrag des Streuvektors ist proportional zur Wellenlänge und zum Sinus des Winkels  $\theta$  zwischen dem eintreffenden Lichtvektor  $\vec{k}_i$  und dem Streulichtvektor  $\vec{k}_s$  (Gleichung 3.7).<sup>[306,307]</sup>



**Abb. 3.1:** Der Streuvektor  $\vec{q}$  ergibt sich als Linearkombination aus den Vektor des einfallenden  $\vec{k}_i$  und des gestreuten Lichts  $\vec{k}_s$ .

Bei der Messung der zeitlichen Fluktuation der Lichtintensität wird keine konstante Lichtintensität  $I(\vec{q}, t)$  als Funktion des Streuvektors und der Zeit betrachtet, sondern eine zeitlich gemittelte Intensität  $\langle I(\vec{q}, t) \rangle$ . Die Streuintensität wird in Messintervallen  $(t + \tau)$  gemessen. Für sehr kleine Messintervalle korreliert die gemessene Fluktuation mit der Bewegung der Partikel. Für größere Messintervalle fällt die Korrelation ab. So lässt sich eine Intensitäts-Zeit-Korrelationsfunktion über die gesamte Messzeit ( $T_M$ ) ermitteln (Gleichung 3.8). Dabei wird die Intensitäts-Zeit-Korrelationsfunktion (Gleichung 3.8) auf die gemessene gemittelte Intensität  $\langle I(\vec{q}, t) \rangle$  normiert (Gleichung 3.9).

$$\vec{q} = \vec{k}_s - \vec{k}_i \quad (3.6)$$

$$q = |\vec{q}| = \frac{4\pi}{\lambda} \sin \frac{\theta}{2} \quad (3.7)$$

$$\langle I(\vec{q}, t) \cdot I(\vec{q}, t + \tau) \rangle \cong \lim_{T_M \rightarrow \infty} \frac{1}{T_M} \int_0^{T_M} I(\vec{q}, t) \cdot I(\vec{q}, t + \tau) dt \quad (3.8)$$

$$g_2(q, \tau) = \frac{\langle I(\vec{q}, t) \cdot I(\vec{q}, t + \tau) \rangle}{\langle I(\vec{q}, t)^2 \rangle} \quad (3.9)$$

Die charakteristische Abklingrate  $\Gamma$  dieser Abklingfunktion ist proportional zum Diffusionskoeffizienten  $D$  und dem Skalarprodukt des Streuvektors  $\vec{q}$  (Gleichung 3.10 und 3.11).

$$\Gamma = Dq^2 \quad (3.10)$$

$$q^2 = \vec{q} \cdot \vec{q} \quad (3.11)$$

Die Siegert-Beziehung (Gleichung 3.12) liefert den Zusammenhang zwischen der normierten Intensitäts-Zeit-Korrelationsfunktion  $g_2(q, \tau)$  und der Feld-Zeit-Korrelationsfunktion  $g_1(q, \tau)$ .  $g_1(q, \tau)$  berücksichtigt die Phase des gestreuten Lichts. Der exponentielle Abfall der Abklingfunktion kann als dynamischer Strukturfaktor  $g_1(q, \tau)$  als Funktion des Streuvektors und der Zeitkonstante beschrieben werden (Gleichung 3.13).<sup>[306,307]</sup>

$$g_2(q, \tau) = 1 + g_1(q, \tau)^2 \quad (3.12)$$

$$g_1(q, \tau) = e^{-Dq^2\tau} = e^{-\Gamma\tau} = \sqrt{\frac{\langle I(\vec{q}, t) \cdot I(\vec{q}, t + \tau) \rangle}{\langle I(\vec{q}, t)^2 \rangle} - 1} \quad (3.13)$$

Reale Dispersionen sind zu einem gewissen Grad polydispers. In solchen Dispersionen klingt  $g_1(q, \tau)$  nicht als einfache exponentielle Funktion ab, sondern ergibt sich zu  $n$  sich überlagernden Exponentialfunktionen mit entsprechenden Gewichtungsfaktoren  $a_i$  und Abklingraten  $\Gamma_i$ , wie in Gleichung 3.14 beschrieben.

Mit einer Kumulantenanalyse (Gleichung 3.15) lässt sich der natürliche Logarithmus des dynamischen Strukturfaktors  $g_1(q, \tau)$  der Feld-Zeit-Korrelationsfunktion als Reihe entwickeln. Dabei liefert der erste Kumulant  $\kappa_1$  den mittleren Diffusionskoeffizienten, welcher zur Berechnung des mittleren hydrodynamischen Durchmessers ( $z$ -average) des Partikels benutzt werden kann (Gleichung 3.4). Der Polydispersitätsindex (PDI) ergibt sich aus

dem zweiten Kumulanten  $\kappa_2$ . Der Polydispersitätsindex wird als Breite der Intensitätsgewichteten Größenverteilung interpretiert.<sup>[306,307]</sup>

$$g_1(q, \tau) = \sum_{i=0}^n a_i e^{-\Gamma_i \tau} \quad (3.14)$$

$$\ln g_1(q, \tau) = -\kappa_1 \tau + \frac{1}{2!} \kappa_2 \tau^2 - \frac{1}{3!} \kappa_3 \tau^3 + \dots \quad (3.15)$$

Alle Messungen der Dynamischen Lichtstreuung wurden mit einem Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern) bei 25 °C durchgeführt. Stabilitätsuntersuchungen in biologischen Medien wurden bei 37 °C in einer temperierten Küvette (Malvern) durchgeführt.

#### 3.9.2 Zeta-Potentialmessungen

Durch Anlegen eines elektrischen Feldes können geladene Nanopartikel im Elektrolyten in Richtung der entgegengesetzt geladenen Elektrode in Bewegung versetzt werden. Die Geschwindigkeit des Nanopartikels  $\mu$  (elektrophoretische Mobilität) ist über die Henry-Gleichung mit dem Zeta-Potential  $\zeta$  verknüpft (Gleichung 3.16).

$$\zeta = \frac{3\eta\mu}{2\epsilon f(\kappa_H r)} \quad (3.16)$$

Die Henry-Funktion ( $f(kr)$ ) ist abhängig vom Radius  $r$  kugelförmiger Partikel, dem Debye-Hückel-Parameter  $\kappa_H$ , und kann nach der Hückel-Smoluchowski-Näherung Werte von 1,0 bis 1,5 annehmen. Die elektrophoretische Mobilität lässt sich mit der Laser-Doppler-Anemometrie bestimmen. Die Phasenverschiebung der Frequenz des an Nanopartikeln rückgestreuten Lichts ist dabei proportional zur elektrophoretischen Mobilität des Nanopartikels (Gleichung 3.17). Ein Schema des Potentialverlaufs als Funktion des Abstandes von einer geladenen Partikeloberfläche ist in Abschnitt 2.4 in Abbildung 2.4 dargestellt.

$$f \propto \mu \quad (3.17)$$

Alle Zeta-Potential-Messungen wurden mit einem Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern Ltd) durchgeführt.



### 3.10 Fluoreszenzspektroskopie

Die Fluoreszenzspektroskopie dient zur qualitativen und quantitativen Messung der Fluoreszenzemission von Stoffen nach Anregung mit einer Lichtquelle. Durch absorbiertes Licht energetisch angeregte Valenzelektronen können bei der Relaxation Energie in Form von Fluoreszenzquanten emittieren. Die Fluoreszenz lässt sich in einem Winkel von  $90^\circ$  detektieren, wodurch die Detektion des Anregungslichts stark vermindert wird.

Alle Messungen wurden mit einem J&M TIDAS Spektrometer (J&M Analytik AG) durchgeführt.

### 3.11 Thermogravimetrische Analyse

Die Thermogravimetrische Analyse (TGA) ermöglicht die gravimetrische Bestimmung der Massenänderung eines Probenmaterials in Abhängigkeit von der Temperatur und der Zeit. Das Probenmaterial wird in einem Aluminiumoxid-Tiegel bei definierter Gasatmosphäre einem Temperaturprofil unterworfen und die Massenänderung als Funktion der Temperatur und der Zeit aufgetragen.<sup>[308]</sup> Das Profil der Massenänderung zeigt je nach Zusammensetzung des Probenmaterials in der Regel charakteristische Bereiche, welche dem Verdampfen flüchtiger Bestandteile oder der Zersetzung des Probenmaterials zugeordnet werden können.

Alle Messungen wurden mit einer konstanten Heizrate von  $1 \text{ K min}^{-1}$  in einer Sauerstoffatmosphäre ( $\dot{V} = 50 \text{ mL min}^{-1}$ ) von  $303,15 \text{ K}$  bis  $1473,15 \text{ K}$  durchgeführt (TG 449 F3 Jupiter<sup>©</sup>, Netzsch).

### 3.12 Fourier-Transformations-Infrarotspektroskopie

Die Fourier-Transformations-Infrarotspektroskopie (FTIR) liefert Aufschlüsse über die Struktur von organischen und zum Teil über die Zusammensetzung von anorganischen Verbindungen. Funktionelle Gruppen von Molekülen können durch Absorption von Infrarotstrahlung in Schwingungen und/oder Rotationen versetzt werden. Die Wellenlängen des absorbierten Lichts sind dabei charakteristisch für bestimmte Schwingungstypen funktioneller Gruppen und erlauben die Identifizierung von Substanzen. Die Energie  $\Delta E$ , welche für die Anregung absorbiert wird, ist proportional zur Wellenzahl  $\nu$ , der reziproken Wellenlänge  $\lambda$  des absorbierten Lichts (Gleichung 3.18).

$$\Delta E = h \cdot \nu \quad (3.18)$$

Neben Valenz- (Änderung der Bindungslängen) und Deformationsschwingungen (Änderung der Bindungswinkel) können auch Kombinationen oder Oberschwingungen mit Banden kleiner als  $1000\text{ cm}^{-1}$  auftreten. Diese können in der Regel nicht eindeutig den Grundschwingungen von funktionellen Gruppen zugeordnet werden, sondern liefern für das ganze Molekül charakteristische Banden, den sogenannten „fingerprint“-Bereich.<sup>[309]</sup>

Alle Proben wurden als Kaliumbromid-Presslinge in einem Vertex 70 (Bruker) vermessen. Hintergrundmessungen der Umgebungsluft wurden automatisch subtrahiert. Alle Spektren wurden im Bereich von  $400$  bis  $4000\text{ cm}^{-1}$  mit einer Abtastrate von  $1\text{ cm}^{-1}$  durchgeführt.

### 3.13 Atomabsorptionsspektroskopie und Elementaranalytik

Die Atomabsorptionsspektroskopie (AAS) und die verbrennungsanalytische Bestimmung von Kohlenstoff, Wasserstoff, Stickstoff, Sauerstoff und Schwefel (CHNS-O) dienen der quantitativen Analyse der elementaren Zusammensetzung einer Probensubstanz. Bei der Atomabsorptionsspektroskopie wird die charakteristische Absorption von Licht durch atomisierte Elemente der Probe (Metalle und Halbmetalle) analysiert. Die Elementaranalyse beruht auf der Verbrennung und gaschromatographischen Analyse von organischen Verbindungen (*dynamic flash combustion*).

Die AAS wurde zur quantitativen Bestimmung der Zusammensetzung der Calciumphosphat-Nanopartikel und des Goldgehalts von Gold-Nanopartikel-Dispersionen verwendet. Gold-Dispersionen wurden in Königswasser gelöst. Wässrige silberdotierte Calciumphosphat-Nanopartikel-Dispersionen wurden in verdünnter Salpetersäure (12 %) gelöst und hinsichtlich der Massekonzentrationen an Calcium, Phosphat und Silber analysiert. Nach zweifachem Zentrifugieren an Luft getrocknete silberdotierte Calciumphosphat-Nanopartikel-Dispersionen ohne Zusatz von Trehalose wurden hinsichtlich ihres Gehaltes (Gew-%) an Calcium, Phosphat, Silber, Kohlenstoff, Stickstoff, Schwefel und Wasserstoff untersucht. Die Atomisierung des Probenmaterials wurde in der Flamme (F-AAS) oder mit einem Graphitrohr (GF-AAS) durchgeführt. Die elementaren Zusammensetzungen sind im Folgenden als Gewichtsprozent ( $x \pm \sigma$ ) oder Massenkonzentrationen angegeben ( $x \pm \sigma$ ).  $\sigma$  bezeichnet die einfache Standardabweichung.<sup>[310]</sup> Alle Untersuchungen wurden mit einem Atomabsorptionsspektrometer (M-Serie, Thermo Electron) und einem EURO EA Elemental Analyzer (EURO VECTOR) durchgeführt.

### 3.14 Röntgen-Kleinwinkelstreuung

Die Röntgen-Kleinwinkelstreuung (SAXS) wird zur Strukturuntersuchung von Materialien im Nanometermaßstab eingesetzt. Es lassen sich auf diese Weise Nanopartikel in Dispersion untersuchen. Neben der Partikelgröße kann unter anderem auch die spezifische Oberfläche der Partikel berechnet werden.<sup>[311]</sup> Die Methode eignet sich insbesondere für die Untersuchung sehr kleiner metallischer Nanopartikel.<sup>[312]</sup>

Alle Untersuchungen wurden mit einem Empyrean (PanAnalytical) bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Auswertung der Daten erfolgte mit der Software EasySAXS (PanAnalytical).

### 3.15 Silberionenfreisetzung aus silberdotierten CMC-stabilisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln in Reinstwasser

Die Freisetzung von Silberionen aus silberdotierten CMC-stabilisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln wurde in Reinstwasser durchgeführt. Die Nanopartikel wurden nach zweifacher Zentrifugation und Redispersion in Reinstwasser, Zugabe von Trehalose-Dihydrat, Sterilfiltration und Gefriertrocknung in Reinstwasser redispersiert. Der Silbergehalt der Dispersionen wurde mittels Flammen-Atomabsorptionsspektroskopie (Abschnitt 3.13) direkt nach der Redispersion bestimmt.

Nach 1, 2, 4, 8 und 24 Stunden wurden die Dispersionen in Zentrifugen-Filtereinheiten mit einer Ausschlussgrenze (MWCO) von 3000 Da (Merck-Millipor) für 30 Minuten bei 3.000 g zentrifugiert und der Silbergehalt im Filtrat mittels Graphitrohr-Atomabsorptionsspektroskopie (Abschnitt 3.13) bestimmt. Die mittleren Porendurchmesser der regenerierten Cellulosemembran sind kleiner 1 nm, so dass keine Partikel die Membran passieren können. Die Freisetzung wird als Anteil der anfänglichen Silberkonzentration in der frisch redispersierten Nanopartikel-Dispersion angegeben.

### 3.16 Berechnung der Löslichkeit von Silberchlorid in biologischen Medien

Berechnungen zur Löslichkeit von Silberchlorid in biologischen Medien wurden mit der Software *Visual MINTEQ* Version 3.0 durchgeführt.<sup>[313]</sup> Die maximale Anzahl an Iterationen betrug 5000.

Zur Korrektur der Aktivitäten wurde die Davies-Näherung der Debye-Hückel-Theorie verwendet.<sup>[314–318]</sup> In Anlehnung an den Carbonatpuffer des RPMI-Zellnährmediums mit  $0,025 \text{ mol L}^{-1}$  2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES) wurde zur Berechnung des pH-Werts der Elektrolytlösung eine konstante Gasatmosphäre von 5 %  $\text{CO}_2$  (V/V) vorgegeben. HEPES zeigt eine vernachlässigbar kleine Komplexbildung mit Metallkationen.<sup>[319]</sup>

Die Anteile aller Silberspezies wurden bei Temperaturen zwischen  $0^\circ\text{C}$  und  $40^\circ\text{C}$  berechnet. Der pH-Wert betrug bei allen Berechnungen in Abhängigkeit von der Temperatur zwischen  $\text{pH}=7,160$  und  $\text{pH}=7,186$ . Die Ladungsdifferenzen zwischen den Summen der Ladungen aller Kationen und den Summen der Ladungen aller Anionen waren bei allen Berechnungen kleiner als  $10^{-5} \%$ . Die Ionenstärke lag bei allen Berechnungen bei  $0,131 \text{ mol L}^{-1}$ .

**Tab. 3.1:** Zusammensetzung von RPMI zur Berechnung des Anteils löslicher Silberkomplexe und festen Silberchlorids. Die Zusammensetzung entspricht den Salzkonzentrationen in RPMI-Medium ohne fetalem Kälberserum.

Komponente	Konzentration / $\text{mol L}^{-1}$	Konzentration / $\text{g L}^{-1}$
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	0,000424	0,10000
$\text{MgSO}_4$	0,000407	0,04884
KCl	0,005333	0,40000
$\text{NaHCO}_3$	0,023810	2,00000
NaCl	0,091380	5,30000
$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	0,005634	0,80000
Hydrochloride von Aminosäuren	0,00066	0,02421
HEPES	0,025034	5,95800

Die Zusammensetzung des Elektrolyten ist in Tabelle 3.1 aufgeführt. Zum Vergleich wurden Berechnungen für *Dulbecco's Modified Eagle Medium*, ein weiteres gängiges Nährmedium, und LB Broth durchgeführt. Die Zusammensetzung von DMEM ist in Tabelle 3.2 zusammengefasst (Life Technologies). Die Anteile der Komplexmedien (FCS, Hefeextrakt und Trypton) wurden bei allen Berechnungen vernachlässigt. Für LB Broth wurden die reinen NaCl-Konzentrationen herangezogen.

**Tab. 3.2:** Zusammensetzung von DMEM zur Berechnung des Anteils löslicher Silberkomplexe und festen Silberchlorids. Die Zusammensetzung entspricht den Salzkonzentrationen in DMEM-Medium ohne fetalem Kälberserum.

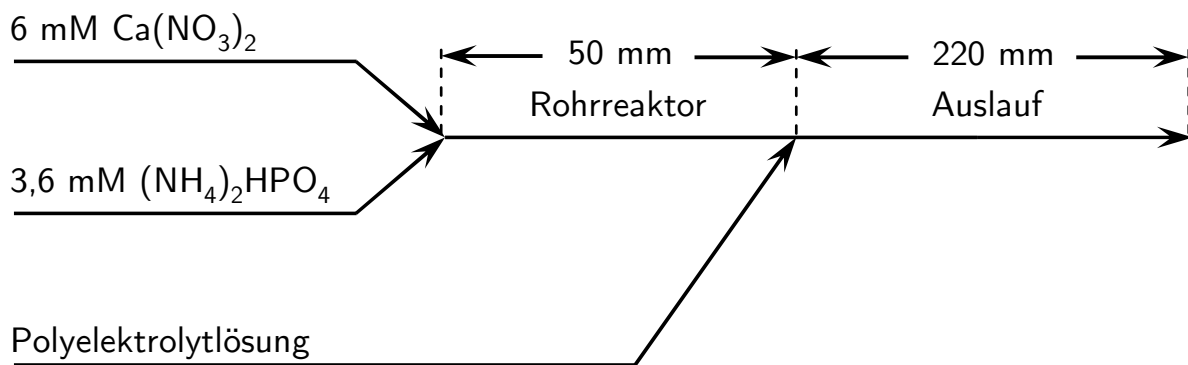
Komponente	Konzentration / $\text{mol L}^{-1}$	Konzentration / $\text{g L}^{-1}$
$\text{CaCl}_2$	0,00180	0,20000
$\text{MgSO}_4$	0,00081	0,09767
KCl	0,00533	0,40000
$\text{NaHCO}_3$	0,04405	3,70000
NaCl	0,11034	6,40000
$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	0,00091	0,12500
Hydrochloride von Aminosäuren	0,00166	0,06041



## 4 Praktische Durchführung

### 4.1 Synthese von Calciumphosphat-Nanopartikeln

Die Synthese von silberdotierten und undotierten Calciumphosphat-Nanopartikeln wurde in wässriger Dispersion durch einen kontinuierlichen Fällungsprozess in einem Rohrreaktor bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Keimbildung und das Partikelwachstum der silberdotierten CaP-NP wurden durch Mischung einer  $6,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  Lösung aus 95 Mol-% Calciumnitrat und 5 Mol-% Silbernitrat und einer  $3,6 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  Diammoniumhydrogenphosphat-Lösung über eine Ypsilonverbindung in einem Rohrreaktor (Länge 50 mm, Innendurchmesser 2,54 mm) realisiert. Undotierte CaP-NP wurden durch Mischung einer  $6,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  Calciumnitrat-Lösung und einer  $3,6 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  Diammoniumhydrogenphosphat-Lösung hergestellt. Die pH-Werte der Ausgangslösungen wurden mit Ammoniaklösung (30 %, Carl Roth) auf 9 eingestellt. Ein schematisches Fließbild des Fällungsprozesses ist in Abbildung 4.1 angegeben.



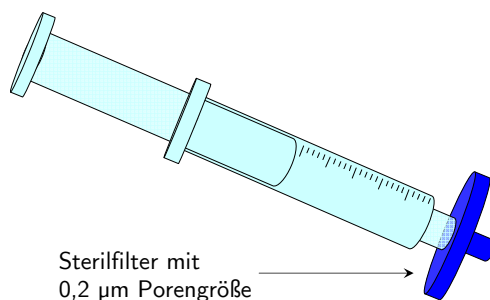
**Abb. 4.1:** Schematisches Fließbild des Rohrreaktors zur Fällung von Calciumphosphat-Nanopartikeln in wässriger Dispersion.

Durch die Wahl von identischen Volumenströmen der beiden Salzlösungen konnte ein molares Verhältnis von Calcium zu Phosphat von 1,667 eingestellt werden. Dieses Verhältnis entspricht dem stöchiometrischen Ca/P-Verhältnis im Hydroxylapatit (Ca<sub>10</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>6</sub>(OH)<sub>2</sub>). Durch die Wahl der Volumenströme konnten unterschiedliche Verweilzeiten im Rohrreaktor realisiert werden. Durch die Zuführung einer Polyelektrolytlösung über eine Ypsilonverbindung am Ende des Rohrreaktors wurden die Keimbildung und das Partikelwachs-

tum gehemmt sowie die Partikel stabilisiert. Die Dispersion wurde über ein Auslaufstück ( $l = 220$  mm) in einem Becherglas aufgefangen.

Die erhaltenen Dispersionen wurden zweimal zentrifugiert (29380  $g$ , 20 min, 20 °C, SORVALL WX Ultra Series, Thermo Scientific) und in Reinstwasser mit einem Ultraschalldisperser (Hielscher UP50H, Sonotrode 2, Amplitude 50 %, Puls 0,8, 2 min) redispergiert, um nicht adsorbierte Polyelektrolytmoleküle und Gegenionen abzutrennen. Die Nanopartikel wurden nach der ersten Zentrifugation in 0,25-fachem Volumen Reinstwasser, nach der zweiten Zentrifugation in 0,1-fachem Volumen Reinstwasser redispergiert. Die Dispersionen wurden dabei von 400 mL auf 8 mL aufkonzentriert.

Für zellbiologische und mikrobiologische Untersuchungen wurden die hochkonzentrierten Dispersionen mit Trehalose-Dihydrat (Sigma Aldrich, Deutschland) versetzt und mit Spritzenvorsatzfiltern (Filtropur S 0.2, Porengröße 0,2  $\mu\text{m}$ , Sarstedt) steril filtriert (Abbildung 4.2). Die Dispersionen wurden zu Volumina von 500  $\mu\text{L}$  aliquotiert und mit einer sterilen gasdurchlässigen Membran (Breathseal<sup>TM</sup>, BioGreinerOne) bedeckt. Zur Langzeitstabilisierung wurden die Dispersionen gefriergetrocknet ( $-7$  °C, 31 Pa, 24 h). Die gefriergetrockneten Nanopartikel wurden luftdicht unter Lichtausschluss bei  $-20$  °C bis zu den biologischen Experimenten gelagert.



**Abb. 4.2:** Spritzenvorsatzfilter für die Sterilfiltration von Calciumphosphat-Nanopartikel-Dispersionen.

Silberdotierte und undotierte Calciumphosphat-Nanopartikel wurden mit einer wässrigen Lösung von Natrium-Carboxymethylcellulose (Sigma Aldrich) mit einer mittleren Molmasse ( $M_w$ ) von 90.000  $\text{g mol}^{-1}$  stabilisiert. Als Stammlösungen wurden Lösungen mit Konzentrationen von 2  $\text{g L}^{-1}$  angesetzt. Die Natrium-Carboxymethylcellulose-Lösung wurde mindestens eine halbe Stunde bei Raumtemperatur gerührt, bis eine homogene Lösung entstand.

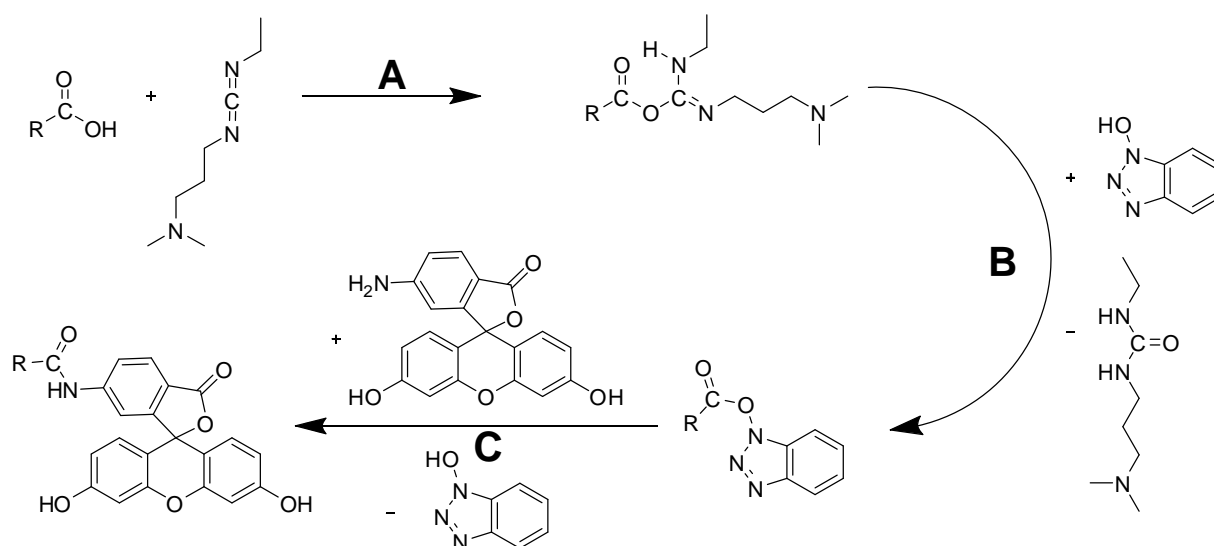
Calciumphosphat-Nanopartikel wurden mit einer wässrigen Lösung von Natrium-Chondroitin-4-sulfat (*bovine trachea*, Sigma Aldrich) stabilisiert. Als Stammlösungen wurden Lösungen mit Konzentrationen von 2  $\text{g L}^{-1}$  angesetzt. Die Lösung von Natrium-Chondro-



itin-4-sulfat wurde mindestens eine halbe Stunde bei Raumtemperatur gerührt, bis eine homogene Lösung erhalten wurde.

## 4.2 Darstellung von 6-Aminofluorescein-Carboxymethylcellulose

Carboxylfunktionen der Carboxymethylcellulose lassen sich mit der Carbodiimid-Methode in Carbonsäureamide umsetzen. Fluoreszenzfarbstoffe mit primären Aminen lassen sich so kovalent an das Polymer anbinden (Abbildung 4.3).<sup>[320,321]</sup> 6-Aminofluorescein eignet sich als grün fluoreszierender Xanthenfarbstoff für zellbiologische mikroskopische Untersuchungen. Die geringe Wasserlöslichkeit des 6-Aminofluoresceins erfordert die Umsetzung mit Carboxymethylcellulose in einem Ethanol-Wasser-Gemisch.<sup>[277]</sup> Die Kopplung wurde mit 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid durchgeführt. Zur Stabilisierung der aktivierten Carbonsäuren wurde 1-Hydroxybenzotriazol (HOBt) verwendet.



**Abb. 4.3:** Reaktionsmechanismus der Carbonsäureamidbildung. Aktivierung der Carboxylfunktion durch 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid unter Bildung eines *O*-Acylisoharnstoffs (**A**), Angriff des nukleophilen 1-Hydroxybenzotriazols und Bildung eines Aktivesters (**B**), Reaktion des Aktivesters mit dem primären Amin des 6-Aminofluoresceins (**C**).

In einem 100 mL Becherglas wurden 0,5 g Carboxymethylcellulose (Natriumsalz, Substitutionsgrad 0,7,  $M_w = 90.000 \text{ g mol}^{-1}$ , Sigma Aldrich) vorgelegt und in 40 mL  $5 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$  *N*-Morpholinoethansulfonsäure-Puffer (MES, pH=5,5) unter Rühren gelöst. Die eingewogene Menge entsprach dabei  $2,292 \cdot 10^{-3} \text{ mol}$  Anhydroglukoseeinheiten und  $1,604 \cdot 10^{-3} \text{ mol}$  Carboxylgruppen. 6-Aminofluorescein (Sigma Aldrich), 1-Hydroxybenzotriazol

(Sigma Aldrich) und 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (Sigma Aldrich) wurden zu gleichen Äquivalenten entsprechend 15 % der Carboxylgruppen ( $2,407 \cdot 10^{-4}$  mol) eingesetzt. 83,6 mg 6-Aminofluorescein wurden in 30 mL Ethanol gelöst und gemeinsam mit 32,5 mg Hydroxybenzotriazol-Hydrat gelöst in 2,5 mL Ethanol mit der wässrigen Carboxymethylcellulose-Lösung vereint. 46,1 mg 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid-Hydrochlorid wurden in 2,5 mL Ethanol gelöst und sofort zu der ethanolischen Carboxymethylcellulose-Lösung gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde für 12 Stunden lichtgeschützt bei Raumtemperatur gerührt (Ansatz 1). Mit einem zweiten Ansatz wurde entsprechend verfahren, wobei auf den Zusatz von 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid verzichtet wurde (Ansatz 2). Die Carboxymethylcellulose beider Ansätze wurde in 80 % Ethanol gefällt und abzentrifugiert. Der erhaltene Feststoff wurde in  $2,5 \cdot 10^{-2}$  mol L<sup>-1</sup> Natriumhydrogencarbonat-Lösung gelöst und in Dialysierschläuchen (SnakeSkin<sup>TM</sup> MWCO 10 kDa, Thermo Scientific) jeweils gegenüber 1,8 L  $2,5 \cdot 10^{-2}$  mol L<sup>-1</sup> Natriumhydrogencarbonat-Lösung dialysiert. Die Dialysierlösung wurde nach 3 Tagen erneuert und die Ansätze für weitere 4 Tage dialysiert. Beide Ansätze wurden eingefroren und bei  $-7$  °C und 31 Pa gefriergetrocknet. Die mit 6-Aminofluorescein umgesetzte Carboxymethylcellulose (Ansatz 1) wird im Folgenden mit F-CMC abgekürzt.

### 4.3 Synthese von F-CMC-stabilisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln

In einem 100 mL Becherglas wurden 0,195 g Carboxymethylcellulose ( $8,938 \cdot 10^{-4}$  mol Anhydroglukoseeinheiten) in 80 mL Reinstwasser unter Rühren gelöst. 32,6 mg 6-Aminofluorescein (entsprechend 15 Mol-% der Carboxylfunktionen) wurden in 15 mL Ethanol gelöst und mit der gelösten Carboxymethylcellulose vereint. In 2 mL Reaktionsgefäßen wurden jeweils äquivalente Stoffmengen ( $8,938 \cdot 10^{-4}$  mol) 1-Hydroxybenzotriazol (12,7 mg) und 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (18,0 mg) eingewogen und in jeweils 1 mL Ethanol gelöst. Die Lösungen wurden sofort mit dem Lösungsgemisch aus Carboxymethylcellulose und 6-Aminofluorescein vereint und unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur für fünf Stunden gerührt (Ansatz 1). Als Kontrollexperiment wurde die Synthese unter Beibehaltung der Synthesebedingungen, aber unter Zugabe von 1 mL Ethanol ohne 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid Hydrochlorid durchgeführt (Ansatz 2).

Die Lösungen der F-CMC wurden zur Stabilisierung von Calciumphosphat-Nanopartikeln verwendet. Die Synthese der Nanopartikel erfolgte nach dem in Abschnitt 4.1 beschriebenen Fällungsprozess.

## 4.4 Synthese von Gold-Nanopartikeln

Gold-Nanopartikel wurden ausgehend von Tetrachlorogoldsäure ( $\text{HAuCl}_4$ ) hergestellt. Die Herstellung von  $\text{HAuCl}_4$  erfolgte durch Lösen von metallischem Gold (99,99 %) in heißem Königswasser. Nach dem Lösen wurde das Lösemittel fast vollständig eingedampft und mit konzentrierter Salzsäure aufgenommen. Nach wiederholtem zweifachen Eindampfen wurde die  $\text{HAuCl}_4$ -Lösung mit Reinstwasser verdünnt und der Goldgehalt mit der AAS bestimmt. Es wurden Gold-Nanopartikel durch Reduktion der Tetrachlorogoldsäure mit den Reduktionsmitteln Natriumborhydrid ( $\text{NaBH}_4$ ) oder einem Gemisch aus Trinatriumcitrat ( $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) und Gerbsäure ( $\text{C}_{76}\text{H}_{52}\text{O}_{46}$ ) in wässriger Phase synthetisiert.

### 4.4.1 Reduktion mit Natriumborhydrid

Gold-Nanopartikel wurden durch Reduktion von  $\text{Au}^{3+}$  zu  $\text{Au}^0$  aus wässriger Lösung der Tetrachlorogoldsäure ( $\text{HAuCl}_4$ ) mit Natriumborhydrid hergestellt. Zur Stabilisierung und Funktionalisierung wurden die Thiol-Liganden Mercaptoethylamin (MEA) und (*RS*)-Liponsäure verwendet. Die Tetrachlorogoldsäure wurde in Reinstwasser vorgelegt und in Gegenwart von Mercaptoethylamin oder (*RS*)-Liponsäure durch Zugabe von Natriumborhydrid reduziert. Die Stoffmengenverhältnisse zwischen Gold, Ligand und Reduktionsmittel wurden variiert. Sie werden im Zusammenhang mit den Ergebnissen diskutiert. Die Reaktionen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

### 4.4.2 Reduktion mit Citrat und Gerbsäure

Gold-Nanopartikel wurden durch Reduktion von  $\text{Au}^{3+}$  zu  $\text{Au}^0$  aus wässriger Lösung der Tetrachlorogoldsäure ( $\text{HAuCl}_4$ ) nach einer Synthese von Mahl dargestellt.<sup>[216]</sup> Als Reduktionsmittel wurden Trinatriumcitrat und Gerbsäure verwendet.

In einem 150 mL Becherglas wurden 90 mL Wasser zum Sieden erhitzt. In der Siedehitze wurden 415  $\mu\text{L}$  ( $2,54 \cdot 10^{-5}$  mol) Tetrachlorogoldsäure unter Rühren zugegeben. Ein Gemisch aus 50 mg ( $1,7 \cdot 10^{-4}$  mol) Trinatriumcitrat-Dihydrat und 12,5 mg Gerbsäure wurde in 5 mL Wasser gelöst und mit der Tetrachlorogoldsäure bei 100 °C vereinigt. Die Farbe der Lösung schlug sofort von gelb nach tiefrot um. Die Gold-Nanopartikel-Dispersion wurde für 5 Minuten bei 100 °C gerührt und dann langsam auf Raumtemperatur abgekühlt.<sup>[216]</sup> Die Citrat/Gerbsäure-stabilisierten Gold-Nanopartikel ließen sich durch Zugabe von Thiol-Liganden funktionalisieren oder durch das Polymer Polyvinylpyrrolidon (PVP) stabilisieren.

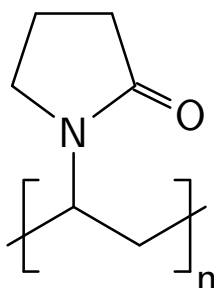
Die unterschiedlich funktionalisierten Gold-Nanopartikel sind in Tabelle 4.1 zusammengestellt.

**Tab. 4.1:** Gold-Nanopartikel funktionalisiert mit unterschiedlichen Liganden oder stabilisiert durch das Polymer Polyvinylpyrrolidon.

Reduktionsmittel	Polymer	Ligand
Citrat/Gerbsäure	Polyvinylpyrrolidon	-
Citrat/Gerbsäure	Polyvinylpyrrolidon	Mercaptoethylamin
Citrat/Gerbsäure	-	Mercaptoethylamin
Citrat/Gerbsäure	Polyvinylpyrrolidon	( <i>RS</i> )-Liponsäure
Citrat/Gerbsäure	-	( <i>RS</i> )-Liponsäure

#### 4.4.3 Stabilisierung durch das Polymer Polyvinylpyrrolidon

Mit einem Gemisch aus Trinatriumcitrat und Gerbsäure reduzierte Gold-Nanopartikel wurden mit dem ungeladenen Polymer Polyvinylpyrrolidon ( $M_W = 4 \cdot 10^4 \text{ g mol}^{-1}$ , Povidon K30, Fluka) stabilisiert (Abbildung 4.4).

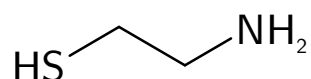


**Abb. 4.4:** Struktur von Polyvinylpyrrolidon.

Dazu wurden zu der auf Raumtemperatur abgekühlten Gold-Dispersion (Abschnitt 4.4.2) 10 mg Polyvinylpyrrolidon ( $3 \cdot 10^{-7} \text{ mol}$  bezogen auf die mittlere Molmasse), gelöst in 5 mL Reinstwasser, gegeben und die Gold-Dispersion für 14 Stunden gerührt. Die Polyvinylpyrrolidon-stabilisierten Gold-Nanopartikel wurden zweifach bei 66.000 g für 30 Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen. Der Bodensatz wurde nach der ersten Zentrifugation im gleichen Volumen Reinstwasser redispergiert. Nach der zweiten Zentrifugation wurden die Gold-Nanopartikel im 0,05-fachen des ursprünglichen Volumens Reinstwasser redispergiert.

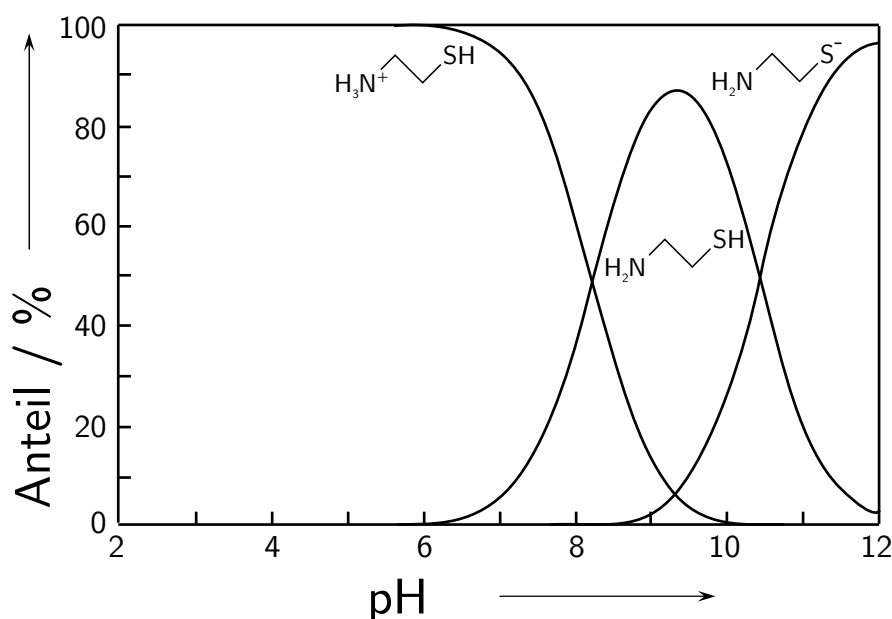
#### 4.4.4 Funktionalisierung durch Mercaptoethylamin

Die Eignung des Thiol-Liganden Mercaptoethylamin (Mercaptoethylamin Hydrochlorid, Sigma Aldrich) zur Stabilisierung von Gold-Nanopartikeln wurde in wässriger Dispersion untersucht. Mercaptoethylamin (Abbildung 4.5) lässt sich im Bereich von pH=1-14 sehr gut in Wasser lösen und besitzt zwei Protolysestufen mit  $pK_S$ -Werten von  $pK_{S1}=8,21$  und  $pK_{S2}=10,44$ .<sup>1</sup>



**Abb. 4.5:** Struktur von Mercaptoethylamin.

Die in wässriger Lösung bei einer Konzentration von  $2 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  vorkommenden Spezies sind als Funktion des pH-Werts in Abbildung 4.6 aufgetragen.<sup>[322]</sup>



**Abb. 4.6:** Spezies in einer wässrigen Lösung von Mercaptoethylamin mit einer Konzentration von  $2 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  als Funktion des pH-Werts.<sup>[322]</sup>

Als heterofunktionaler Ligand besitzt Mercaptoethylamin eine hohe Affinität zu Goldoberflächen und bildet eine selbstorganisierende Monoschicht (SAM) mit einem Bede-

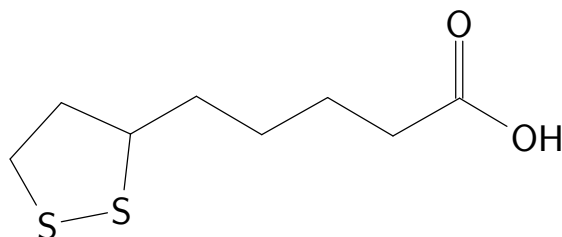
<sup>1</sup>SciFinder®, Web Version, Mercaptoethylamine, CAS: 60-23-1, berechnet mit Advanced Chemistry Development (ACD/Labs) Software V11.02, Stand 27.10.12

ckungsgrad von  $10^{-5} \text{ mol m}^{-2}$  aus.<sup>[323]</sup> Dabei kann Mercaptoethylamin eine lineare oder gewinkelte Konformation einnehmen<sup>[324]</sup>, wobei die Thiolfunktionen eine höhere Affinität zur Goldoberfläche besitzen als die Aminofunktionen.<sup>[325]</sup> Die Thiolat-Gold-Bindung lässt sich als schwache kovalente Bindung mit Bindungsenergien von 160 bis 210  $\text{kJ mol}^{-1}$  beschreiben.<sup>[326,327]</sup>

Mercaptoethylamin-funktionalisierte Gold-Nanopartikel wurden durch Umfunktionalisierung von Citrat/Gerbsäure-stabilisierten Gold-Nanopartikeln oder durch Vorlage eines wässrigen Gemisches aus Tetrachlorogoldsäure und Mercaptoethylamin und Reduktion mit Natriumborhydrid hergestellt. Die Synthesebedingungen werden zusammen mit den Ergebnissen diskutiert.

#### 4.4.5 Funktionalisierung durch (*RS*)-Liponsäure

Neben Thiol-Liganden können auch Disulfide ähnliche Bindungen mit Goldoberflächen ausbilden.<sup>[326,328,329]</sup> Die Eignung des Thiol-Liganden (*RS*)-Liponsäure (( $\pm$ )- $\alpha$ -Lipoic acid, Sigma Aldrich) zur Stabilisierung von Gold-Nanopartikeln wurde in wässriger Dispersion untersucht. Das racemische Gemisch aus (*R*)- und (*S*)-Liponsäure lässt sich bei  $\text{pH} > 7$  mit steigendem pH-Wert mäßig bis gut in Wasser lösen ( $\geq 0,34 \text{ mol L}^{-1}$ ).<sup>1</sup> Die Struktur ist in Abbildung 4.7 gezeigt.



**Abb. 4.7:** Struktur von (*RS*)-Liponsäure.

(*RS*)-Liponsäure-funktionalisierte Gold-Nanopartikel wurden durch Umfunktionalisierung von Citrat/Gerbsäure-stabilisierten Gold-Nanopartikeln oder durch Vorlage eines wässrigen Gemisches aus Tetrachlorogoldsäure und (*RS*)-Liponsäure und Reduktion mit Natriumborhydrid hergestellt. Die Synthesebedingungen werden zusammen mit den Ergebnissen diskutiert.

---

<sup>1</sup>SciFinder®, Web Version, 1,2-Dithiolane-3-pentanoic acid, CAS: 1077-28-7, berechnet mit Advanced Chemistry Development (ACD/Labs) Software V11.02, Stand 27.10.12

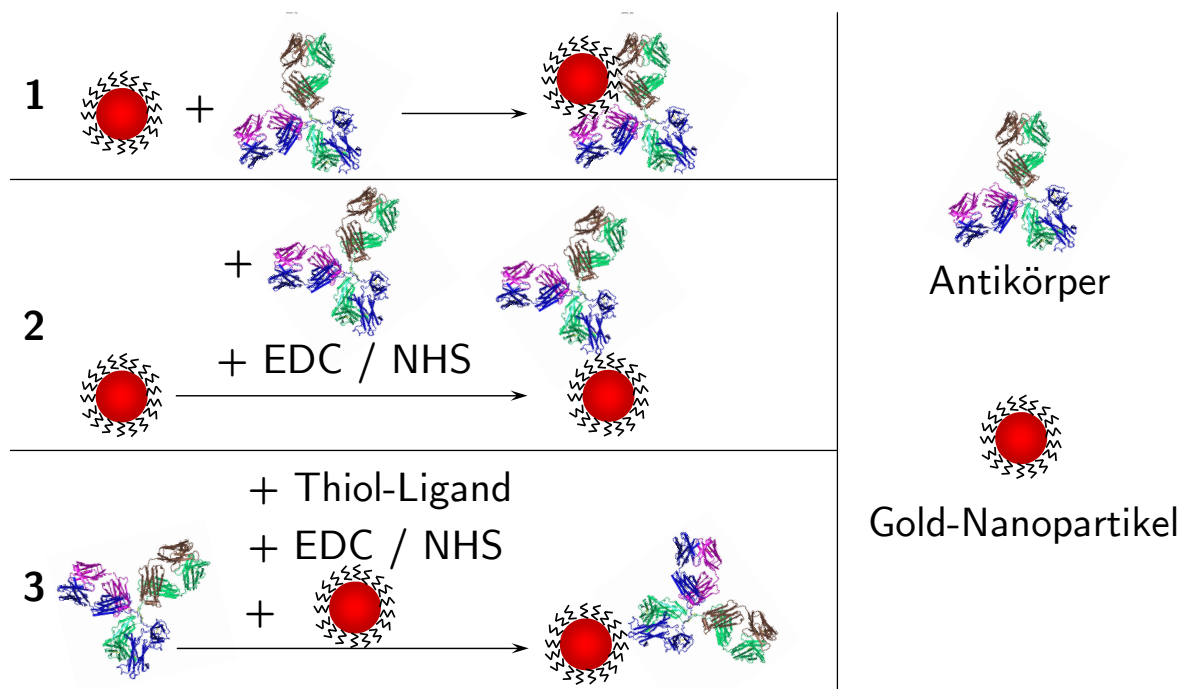
#### 4.4.6 Darstellung von IgG-Antikörper-Gold-Nanopartikel-Konjugaten

Die Funktionalisierung von Gold-Nanopartikeln wurde mit polyklonalen Antikörpern (AK) der Klasse G der Immunglobuline (IgG,  $M_w = 160.000 \text{ g mol}^{-1}$ ) menschlichen Ursprungs (humanes Serum, antibodies-online) durchgeführt. Es wurden drei Strategien zur Funktionalisierung gewählt.

Nach Strategie 1 wurden Gold-Nanopartikel mit Antikörpern inkubiert und die rein adsorptive Wechselwirkung untersucht.

Nach Strategie 2 wurden Gold-Nanopartikel mit Antikörpern inkubiert und die Carboxylfunktionen (*RS*)-Liponsäure-funktionalisierter Gold-Nanopartikel durch Zugabe von 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (Sigma Aldrich) und *N*-Hydroxysuccinimid (Fluka) aktiviert. Aktivierte Carboxylfunktionen können mit primären Aminen der Antikörper zu Carbonsäureamiden umgesetzt werden.

Nach Strategie 3 wurden IgG-Antikörper mit (*RS*)-Liponsäure oder mit Mercaptoethylamin inkubiert und die Carboxylfunktionen mit 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid und *N*-Hydroxysuccinimid zur Umsetzung zu Carbonsäureamiden aktiviert. Die einzelnen Synthesestrategien sind in Abbildung 4.8 schematisch zusammengefasst.



**Abb. 4.8:** Synthesestrategien für die Synthese von IgG-Antikörper-Gold-Nanopartikel-Konjugaten.

IgG-Antikörper-Gold-Nanopartikel-Konjugate wurden mit unterschiedlichen Gold-Nanopartikeln hergestellt. Die Synthesebedingungen werden in Abschnitt 5.9 beschrieben und

diskutiert. Abbildungen von Proteinstrukturen wurden mit der Software Cn3D 4.3 anhand von Literaturdaten (*National Center for Biotechnology Information*, NCBI) erstellt.<sup>[330]</sup>

### 4.5 Biologische Experimente

Zur Beurteilung der toxischen Wirkung der in den biologischen Experimenten verwendeten silberdotierten Calciumphosphat-Nanopartikel-Dispersionen wurden neben den Wachstumskontrollen (Zellen/Bakterien in reinem Nährmedium) undotierte Calciumphosphat-Nanopartikel-Dispersionen als Negativkontrollen und Silberacetatlösungen als Positivkontrollen eingesetzt. Alle untersuchten Organismen wurden mit identischen Konzentrationen an Nanopartikeln oder Silberacetatlösung inkubiert. Die Medien wurden dabei zu 10 % ( $V/V$ ) verdünnt. Die Konzentrationen an Nanopartikeln in den Negativkontrollen mit undotierten Calciumphosphat-Nanopartikeln wurden auf den Calciumgehalt der silberdotierten Calciumphosphat-Nanopartikel normiert.

#### 4.5.1 Eukaryotische Zelllinien

Untersuchungen zur Zytotoxizität silberdotierter Calciumphosphat-Nanopartikel wurden an humanen mesenchymalen Stammzellen (hMSCs) und mononukleären Zellen des peripheren Blutes durchgeführt. Die Abweichungen der Zellvitalitäten wurden auf ihre statistische Signifikanz (Zweistichproben- $t$ -Test) getestet und ab einem Vertrauensbereich von  $p < 0,05$  als toxische Konzentrationen definiert.

##### 4.5.1.1 Humane mesenchymale Stammzellen

Humane mesenchymale Stammzellen (hMSCs, 3. bis 8. Passage, Lonza) wurden in RPMI-Zellnährmedium mit Zusatz von 10 % ( $V/V$ ) fetalem Kälberserum in 24-Wellplatten (Falcon, Becton Dickinson) bei 37 °C in feuchter Atmosphäre mit 5 %  $\text{CO}_2$  kultiviert. Je nach Proliferation wurden die Zellen zur Vermeidung von Konfluenz alle 7 bis 14 Tage subkultiviert. Adhärente Zellen wurden mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen und mit  $0,2 \text{ mL cm}^{-2}$  einer Mischung aus 0,25 % Trypsin und 0,1 % Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) für 5 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden zweifach mit RPMI-Zellnährmedium mit Zusatz von 10 % fetalem Kälberserum ( $V/V$ ) gewaschen. Die biologische Wirkung von Silberionen sowie undotierten und silberdotierten Calciumphosphat-Nanopartikeln wurde an subkonfluenten Zellen ( $2 \cdot 10^4$  Zellen pro Well) während 24-stündiger Inkubation untersucht.



Die Vitalität und die Morphologie der Stammzellen wurde nach der Inkubation mit Silberionen, undotierten und silberdotierten Calciumphosphat-Nanopartikeln mikroskopisch durch Anfärbung lebender Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff Calcein-Acetoxy-methylester (Calcein-AM, Calbiochem) überprüft. Lebende Zellen zeigen dabei eine grüne Fluoreszenz. Die Zellen wurden zweifach mit RPMI gewaschen und mit  $1 \mu\text{mol L}^{-1}$  Calcein-AM bei  $37^\circ\text{C}$  und  $5\%$   $\text{CO}_2$  für 30 Minuten inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen mit RPMI gewaschen und mikroskopisch untersucht (Olympus MVX10, Olympus). Die Morphologie der Stammzellen wurde mittels Phasenkontrastmikroskopie (Olympus CK 2, Olympus) untersucht.

Die Endozytose von F-CMC-stabilisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln durch hMSCs wurde mit konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie und Durchflusszytometrie untersucht. Für die CLSM-Aufnahmen wurden die Zellen subkonfluent in Zellkulturkammern (Lab-Tek<sup>TM</sup>, Thermo Scientific) in RPMI mit  $10\%$  FCS ( $V/V$ ) für 24 Stunden bei  $37^\circ\text{C}$  und  $5\%$   $\text{CO}_2$  inkubiert. Nach 24 Stunden wurde das Medium mit Calciumphosphat-Nanopartikeln versetzt. Die Partikelkonzentration wurde dabei auf eine Calciumkonzentration von  $25 \mu\text{g mL}^{-1}$  normiert. Nach 24 Stunden wurden die Endosomen und Lysosomen für 30 Minuten mit  $5 \cdot 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$  Lyso Tracker<sup>®</sup> Red DND-99 in RPMI ohne Zusatz von FCS angefärbt. Die Zellkerne wurden für 5 Minuten mit  $1,62 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  Hoechst 33342 in RPMI ohne Zusatz von FCS angefärbt. Die Zellen wurden dreifach mit RPMI ohne FCS gewaschen und unmittelbar mikroskopiert (LSM 700, Zeiss).

Für die Durchflusszytometrie wurden die Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen an F-CMC-stabilisierten Calciumphosphat-Nanopartikel für 24 Stunden bei  $37^\circ\text{C}$  mit  $5\%$   $\text{CO}_2$  kultiviert. Die Partikelkonzentrationen wurden auf die Calciumkonzentrationen normiert. Als Negativkontrollen wurden hMSCs mit CMC-stabilisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln inkubiert. Die adhären Zellen wurden mit frischem RPMI-Medium gewaschen und mit  $0,2 \text{ mL cm}^{-2}$  einer Mischung aus  $0,25\%$  Trypsin und  $0,1\%$  EDTA für 5 Minuten bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden zentrifugiert und in RPMI-Medium resuspendiert. Die Zellaufnahme wurde mit jeweils 10000 Zellen quantifiziert (FACSCalibur<sup>TM</sup>, Becton Dickinson).

Für die osteogene, adipogene und chondrogene Differenzierung wurden subkonfluent wachsende Zellen für 24 Stunden in RPMI mit  $10\%$  FCS ( $V/V$ ) bei  $37^\circ\text{C}$  und  $5\%$   $\text{CO}_2$  inkubiert. Danach wurde das Medium durch frisches RPMI-Medium mit  $10\%$  FCS ( $V/V$ ) ersetzt und die Zellen mit CS-stabilisierten und CMC-stabilisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln für weitere 24 Stunden bei  $37^\circ\text{C}$  und  $5\%$   $\text{CO}_2$  inkubiert. Nach 24 Stunden wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit osteogenem oder adipogenem Differenzierungsmedium für 21 Tage (osteogene Differenzierung) und 14 Tage (adipogene Dif-

ferenzierung) inkubiert. Die osteogene Differenzierung wurde durch Fixierung der Zellen mit wässriger Formaldehydlösung (4 %-ig) und Anfärbung mit *Alizarin Red S* (1 %-ige Lösung) untersucht. Die adipogene Differenzierung wurde durch Fixierung der Zellen mit wässriger Formaldehydlösung (4 %-ig) und Anfärbung mit dem Azofarbstoff *Oil Red O* durchgeführt. Nach der Färbung wurde die Differenzierung der Zellen lichtmikroskopisch (EVOS xl core Durchlichtmikroskop, PEQLAB Biotechnologie) erfasst. Die Quantifizierung erfolgte photometrisch durch Extraktion der Farbstoffe mit Cetylpyridiniumchlorid (10 %-ig, *Alizarin Red S*) und Nonylphenylpolyethylenglycol-Lösung (4 %-ig, *Oil Red O*). Die Extinktion von *Alizarin Red S* wurde bei 570 nm (Microplate-Reader, MRX Revelation, Dynex Technologies), die Extinktion von *Oil Red O* bei 520 nm (Ultrospec 3100 pro, GE Healthcare) gemessen. Für die chondrogene Differenzierung wurde die Zellen pelletiert und für 21 Tage in chondrogenem Differenzierungsmedium bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach 21 Tagen wurden die Zellen mit Formaldehydlösung (4 %-ig) fixiert, mit dem Phthalocyanin-Farbstoff *Alcian Blue* angefärbt und mikroskopiert (EVOS xl core Durchlichtmikroskop, PEQLAB Biotechnologie).

Die zellbiologischen Untersuchungen an humanen mesenchymalen Stammzellen wurden von Frau Dr. Christina Greulich, chirurgische Forschung am Berufsgenossenschaftlichen Universitätsklinikum Bergmannsheil in Bochum, durchgeführt.

##### 4.5.1.2 Periphere mononukleäre Blutzellen

Einkernige Zellen des Blutes (Monozyten und Lymphozyten) wurden aus dem Blut von freiwilligen Spendern entsprechend der Ethik-Kommission der Medizinischen Fakultät der Ruhr-Universität Bochum (#3036-07) mittels Ficoll-Gradienten-Zentrifugation isoliert.

Das mit EDTA versetzte periphere Blut (9 mL Monovette®, Sarstedt) wurde mit einem äquivalenten Volumen Kochsalzlösung (0,9 %) versetzt und vorsichtig auf einen doppelten Dichtengradienten geschichtet. Der Dichtegradient bestand aus einer oberen Schicht (10 mL) eines Gemisches der wässrigen Lösungen von Saccharose/Epichlorhydrin-Copolymer und Natriumamidotrizoat mit einer Dichte von 1,077 g mL<sup>-1</sup> und 10 mL einer unteren Schicht mit einer Dichte von 1,119 g mL<sup>-1</sup> (Histopaque 1077 und Histopaque 1119) in 50 mL-Zentrifugenröhrchen. Das Blut wurde bei 700 g für 30 Minuten zentrifugiert. Die im Gradienten isolierten mononukleären Blutzellen wurden mit PBS gewaschen und bei 200 g und 4 °C für 15 Minuten zentrifugiert. Auf diese Weise wurden zu 95 % reine und vitale mononukleäre Blutzellen erhalten. Die Zellzahl wurde mit einer Neubauer Zählkammer und Türk-Lösung zur Anfärbung der Monozyten und Lymphozyten bestimmt. Die Zellzahl wurde durch Suspension in RPMI-Zellnährmedium mit Zusatz von L-Glutamin

(0,3 g L<sup>-1</sup>), 10% (V/V) FCS, und 0,025 mol L<sup>-1</sup> 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES) auf 10<sup>6</sup> Zellen mL<sup>-1</sup> eingestellt.

Die peripheren mononukleären Blutzellen wurden in 24-Wellplatten bei 37 °C in feuchter Atmosphäre mit 5 % CO<sub>2</sub> mit Silberionen, undotierten und silberdotierten Calciumphosphat-Nanopartikeln inkubiert. Die Vitalität der mononukleären Blutzellen wurde durch Anfärbung der toten Zellen mit 7-Aminoactinomycin D (7-AAD) mittels Durchflusszytometrie (FACS, FACSCalibur<sup>TM</sup>, Becton Dickinson) ermittelt.

Die zellbiologischen Untersuchungen an peripheren mononukleären Blutzellen wurden von Frau Dr. Christina Greulich, chirurgische Forschung am Berufsgenossenschaftlichen Universitätsklinikum Bergmannsheil in Bochum, durchgeführt.

#### 4.5.1.3 MG-63 Osteosarkom-Zellen

Osteosarkomzellen der sekundären Zelllinie MG-63 wurden für mikroskopische Untersuchungen zur Aufnahme von F-CMC-stabilisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln in eukaryotischen Zellen verwendet. MG-63 Zellen (35. Passage) wurden mit Nanopartikel-Dispersionen in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM GlutaMAX<sup>TM</sup>, Life Technologies) mit 10 % fetalem Kälberserum (V/V, Life Technologies) zu 2,5 · 10<sup>4</sup> Zellen pro Kammer in Kammerdeckgläsern (BD Falcon<sup>TM</sup> CultureSlides, BD Biosciences) bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> für 24 Stunden inkubiert. Die Zellen wurden nach 24 Stunden mit frischem Medium und Calciumphosphat-Nanopartikeln versetzt. Das Medium wurde dabei zu 10 % (V/V) verdünnt. Die Partikelkonzentrationen wurden auf eine Calciumkonzentration von 50 µg mL<sup>-1</sup> normiert. Die Zellen wurden für 3 Stunden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach der Inkubation wurden pro Kammer 10 µL einer 5 mg mL<sup>-1</sup> 4',6-Diamidin-2-phenylindol-Lösung (DAPI, Life Technologies) in Dimethylsulfoxid (DMSO) und 0,5 µL CellMask<sup>TM</sup> Deep Red (5 mg mL<sup>-1</sup> in DMSO, Life Technologies) zugegeben. Nach einstündiger Inkubation bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> wurde das Medium abgesaugt, die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und die Kammern von den Objektträgern entfernt. Die Objektträger wurden mit Eindeckmedium (Dako, Agilent Technologies) und Deckgläschen bedeckt und mit einem Leica SP5 inversen konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop mikroskopiert.

#### 4.5.2 Bakterienstämme

Mikrobiologische Untersuchungen zur toxischen Wirkung von silberdotierten Carboxymethylcellulose-stabilisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln wurden an *Escherichia coli* (*E. coli*, gramnegativ) DH5α (Life Technologies, DSMZ 6897) und *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*, grampositiv, DSMZ 1104) durchgeführt. Als charakteristische Silberkonzen-

trationen wurden in Abhängigkeit von der Zelldichte die minimalen inhibierenden Konzentrationen (MHK) und die minimalen bakteriziden Konzentrationen (MBK) bestimmt. Die Bakterien wurden mit Silberacetatlösung sowie undotierten und silberdotierten CMC-stabilisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln aufsteigender Silberkonzentration versetzt. Das Medium wurde dabei jeweils um 10 % (V/V) verdünnt. Die Stammlösungen und Stammdispersionen wurden mit sterilem Reinstwasser entsprechend verdünnt, so dass bei allen Versuchen die Volumina konstant gehalten wurden. Die Experimente wurden in LB Broth-Medium und in RPMI-Zellnährmedium mit Zusatz von 10 % (V/V) fetalem Kälberserum durchgeführt. Der pH-Wert des RPMI-Mediums wurde durch Begasung mit 5 % CO<sub>2</sub> konstant gehalten. Parallel wurden jeweils Wachstumskontrollen in reinem Medium bei 37 °C durchgeführt.

Die minimalen inhibierenden Konzentrationen wurden durch Messung der optischen Dichte (Turbidität) bei einer Wellenlänge von 600 nm nach der Inkubation bei 37 °C für 8 Stunden ermittelt. Die minimalen bakteriziden Konzentrationen wurden durch Ausstreichen der zuvor in Nährmedium inkubierten Bakterien auf LB-Agar-Platten über Nacht ermittelt. Die minimale bakterizide Konzentration wurde als diejenige Konzentration definiert, bei der keine koloniebildenden Einheiten nach der Inkubation bei 37 °C über Nacht auf den LB-Agar-Platten beobachtet werden konnten.<sup>[331,332]</sup>

Die mikrobiologischen Untersuchungen wurden von Herrn Dieter Braun, Molekulare Enzymtechnologie und Biochemie der Universität Duisburg-Essen, und Frau Dr. Christina Greulich, chirurgische Forschung am Berufsgenossenschaftlichen Universitätsklinikum Bergmannsheil in Bochum, durchgeführt.

##### 4.5.2.1 *Escherichia coli*

In wässriger 50 %-iger (V/V) Glycerollösung tiefgefrorene *E. coli* DH5 $\alpha$  wurden in 5 mL LB Broth-Nährmedium (Sigma Aldrich) über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Übernachtskulturen wurden durch Verdünnung auf die in den Versuchen eingesetzten Zelldichten (10<sup>3</sup> bis 10<sup>6</sup> mL<sup>-1</sup>) mittels eines Densichek<sup>TM</sup> Photometers (BioMérieux) eingestellt.

##### 4.5.2.2 *Staphylococcus aureus*

Die gefriergetrockneten Kulturen von *S. aureus* 1104 (DSMZ) wurden in 5 mL LB Broth Nährmedium (Sigma Aldrich) über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Übernachtskulturen wurden durch Verdünnung auf die in den Versuchen eingesetzten Zelldichten (10<sup>3</sup> bis 10<sup>6</sup> mL<sup>-1</sup>) mittels eines Densichek<sup>TM</sup> Photometers (BioMérieux) eingestellt.

## 5 Ergebnisse und Diskussion

### 5.1 Silberdotierte Calciumphosphat-Nanopartikel

Carboxymethylcellulose-stabilisierte Calciumphosphat-Nanopartikel wurden nach dem in Abschnitt 4.1 dargestellten kontinuierlichen Fällungsprozess in wässriger Dispersion hergestellt. Die Keimbildung und das Partikelwachstum der Nanopartikel wurden durch Mischung einer  $6,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  Lösung aus 95 Mol-% Calciumnitrat und 5 Mol-% Silbernitrat und einer  $3,6 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  Diammoniumhydrogenphosphat-Lösung über eine Ypsilon-Verbindung in einem Rohrreaktor (Länge 50 mm, Innendurchmesser 2,54 mm) realisiert. Die Calciumphosphat-Nanopartikel wurden durch Zulauf einer Carboxymethylcellulose-Lösung der Konzentration  $2 \text{ g L}^{-1}$  hergestellt. Die erhaltenen Dispersionen wurden durch zweifache Zentrifugation und Redispersion in Reinstwasser von überschüssigem Polymer und in Lösung verbliebenen Ionen befreit und aufkonzentriert.

Zur Ermittlung der geeigneten Fällungsparameter wurden die Volumenströme der Salzlösungen und der Carboxymethylcellulose-Lösungen variiert. Die Dispersionen wurden unmittelbar nach der Synthese und nach Zentrifugation und Redispersion in Reinstwasser hinsichtlich ihrer Dispersität und Stabilität mit der Dynamischen Lichtstreuung untersucht.

In Tabelle 5.1 sind die mittleren hydrodynamischen Durchmesser (*z-average*) und die zugehörigen Polydispersitätsindizes (PDI) für unterschiedliche Verweilzeiten des Reaktionsgemisches im Rohrreaktor und Volumenströmen an Carboxymethylcellulose-Lösung zusammengestellt. Die Verweilzeiten des Reaktionsgemisches im Rohrreaktor entsprachen dabei Volumenströmen von  $30 \text{ mL min}^{-1}$  ( $\tau = 0,5 \text{ s}$ ) und  $50 \text{ mL min}^{-1}$  ( $\tau = 0,3 \text{ s}$ ). Bei längeren Verweilzeiten wurden Partikel mit mittleren hydrodynamischen Durchmessern  $> 250 \text{ nm}$  erhalten.

Die hydrodynamischen Durchmesser der CMC-stabilisierten Calciumphosphat-Nanopartikel direkt nach der Fällung lagen im Bereich von 170 bis 223 nm. Die Zetapotentiale lagen im Bereich von -25,6 bis -31,8 mV, wobei mit zunehmender Menge an Carboxymethylcellulose negativere Zetapotentiale gemessen wurden.

Nach der Abtrennung von überschüssiger CMC durch Zentrifugation und Redispersion in Reinstwasser zeigten alle Dispersionen deutlich kleinere hydrodynamische Durchmesser

**Tab. 5.1:** Mittlere hydrodynamische Durchmesser CMC-stabilisierter Calciumphosphat-Nanopartikel direkt nach der Synthese und nach Zentrifugation und Redispersion in Reinstwasser.

Verweilzeit ( $\tau$ ) / s	CMC / mL min <sup>-1</sup>	nach der Synthese			redispergiert		
		$d$ / nm	PDI	$\zeta$ / mV	$d$ / nm	PDI	$\zeta$ / mV
0,50	5,0	198	0,139	-27,3	186	0,096	-21,4
	7,5	209	0,127	-29,3	186	0,102	-24,8
	10,0	204	0,141	-29,4	179	0,106	-24,5
	12,5	207	0,147	-29,2	180	0,125	-24,1
	15,0	210	0,151	-30,7	185	0,129	-24,2
	17,5	211	0,139	-31,8	187	0,088	-26,3
	20,0	215	0,143	-31,7	175	0,114	-22,8
	25,0	223	0,167	-30,6	176	0,070	-23,8
0,30	5,0	173	0,118	-25,6	163	0,128	-21,6
	7,5	175	0,118	-26,8	163	0,083	-22,3
	10,0	173	0,136	-27,9	161	0,123	-22,7
	12,5	172	0,163	-28,4	156	0,101	-22,2
	15,0	172	0,146	-29,3	157	0,089	-24,7
	17,5	173	0,147	-28,4	160	0,126	-21,4
	20,0	174	0,146	-28,6	155	0,105	-24,1
	25,0	179	0,142	-30,3	159	0,103	-22,5

(155 bis 187 nm). Bei der kürzeren Verweilzeit des Reaktionsgemisches im Rohrreaktor ( $\tau = 0,3$  s) und der daraus resultierenden kürzeren Nukleations- und Wachstumsphase vor der Zugabe von Carboxymethylcellulose-Lösung konnten Calciumphosphat-Nanopartikel mit kleineren hydrodynamischen Durchmessern hergestellt werden. Die Beschallung mit Ultraschall führte zu einer Vereinzelung der durch die Zentrifugation aggregierten Nanopartikel und die Dispersionen zeigten anhand der Polydispersitätsindizes einen deutlich monodisperseren Charakter.

Die Strömungsverhältnisse in einem Rohrreaktor (Strömungsrrohr) lassen sich mit der Reynolds-Zahl ( $Re$ ) beschreiben. Als dimensionslose Kennzahl beschreibt die Reynolds-Zahl das Verhältnis von Trägheitskräften zu Zähigkeitskräften eines Fluids (Gleichung 5.1).<sup>[333]</sup>

$$Re = \frac{d_i \rho v}{\eta} \quad (5.1)$$

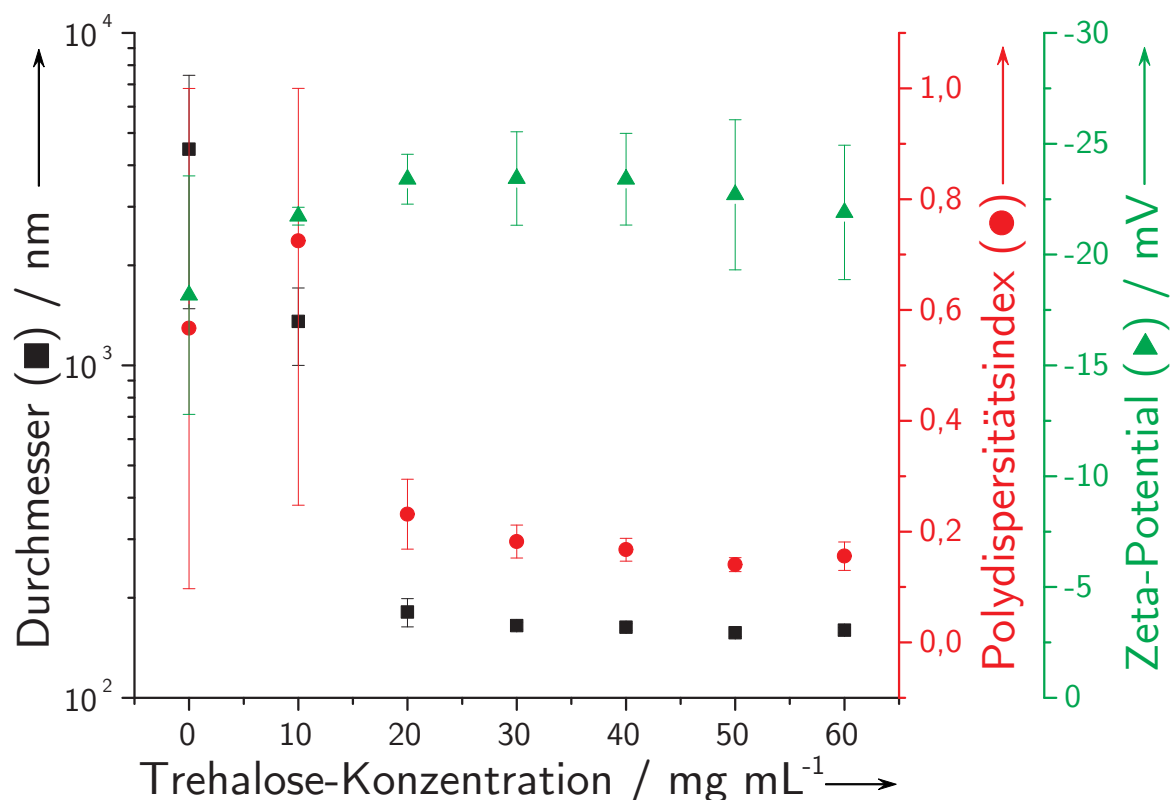
In die Gleichung gehen der Innendurchmesser des Rohrreaktors ( $d_i$ ), die Dichte ( $\rho$ ), die Strömungsgeschwindigkeit ( $v$ ) und die dynamische Viskosität ( $\eta$ ) des Fluids ein. Bei einem Volumenstrom im Rohrreaktor von  $50 \text{ mL min}^{-1}$  ergibt sich bei einer Viskosität der wässrigen Lösungen von  $8,902 \cdot 10^{-4} \text{ kg m}^{-1} \text{ s}^{-1}$  [334] die Reynolds-Zahl entsprechend Gleichung 5.2.

$$Re = \frac{2,54 \cdot 10^{-3} \text{ m} \cdot 10^3 \text{ kg m}^{-3} \cdot 8,333 \cdot 10^{-7} \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}}{\pi \cdot 1,27^2 \cdot 10^{-6} \text{ m}^2 \cdot 8,902 \cdot 10^{-4} \text{ kg m}^{-1} \text{ s}^{-1}} = 469 \quad (5.2)$$

Für kleine Reynolds-Zahlen kann eine laminare Strömung angenommen werden.  $Re$  liegt deutlich unterhalb der kritischen Reynolds-Zahl ( $Re=2300$ ), ab der eine turbulente Strömung zu erwarten ist. Die Strömung wird durch den Einsatz von peristaltischen Pumpen gepulst, wodurch eine geringfügige Durchmischung erreicht wird. Der Zulauf der beiden Salzlösungen ist in Phase, und eine große Abweichung vom grundsätzlich laminaren Strömungsverhalten ist nicht anzunehmen. Die Durchmischung im Rohrreaktor ist damit größtenteils diffusionsbestimmt. Der Zulauf der Polyelektrolytlösung im Anschluss an den Rohrreaktor erzeugt einen Gesamtvolumenstrom von maximal  $75 \text{ mL min}^{-1}$  im Auslauf.  $Re$  liegt mit 704 immer noch deutlich unter der kritischen Reynolds-Zahl für eine turbulente Strömung. Obwohl der peristaltische Volumenstrom der Polyelektrolytlösung mit dem Volumenstrom am Ende des Rohrreaktors nicht in Phase ist, kann für das Auslaufstück keine vollständige Durchmischung angenommen werden. [335–337] Die Strömungsverhältnisse ermöglichen dennoch eine hinreichende Durchmischung der Lösungen, so dass monodisperse Calciumphosphat-Nanopartikel gefällt werden können.

Für die zellbiologischen Untersuchungen wurden die Fällungsparameter für alle Dispersionen vereinheitlicht und konstant gehalten. Dazu wurde eine Verweilzeit von  $\tau = 0,3 \text{ s}$  mit entsprechenden Volumenströmen der Salzlösungen von jeweils  $25 \text{ mL min}^{-1}$  und ein Volumenstrom der Carboxymethylcellulose-Lösung von  $12,5 \text{ mL min}^{-1}$  gewählt.

Abbildung 5.1 zeigt die kolloidchemische Charakterisierung CMC-stabilsierter Calciumphosphat-Nanopartikel-Dispersionen in Abhängigkeit von der Konzentration an Trehalose-Dihydrat. Den Dispersionen wurden nach zweifacher Ultrazentrifugation und Redispersion in Reinstwasser unterschiedliche Mengen an Trehalose-Dihydrat zugegeben. Die Dispersionen wurden steril filtriert, schockgefroren (flüssiger Stickstoff), gefriergetrocknet und nach



**Abb. 5.1:** Einfluss der Trehalosekonzentration auf die kolloidchemischen Eigenschaften CMC-stabilsierter Calciumphosphat-Nanopartikel nach der Gefriertrocknung. Ohne Trehalose und bei nur 10 mg mL<sup>-1</sup> wird die kolloidale Stabilität nach der Gefriertrocknung nicht erhalten.

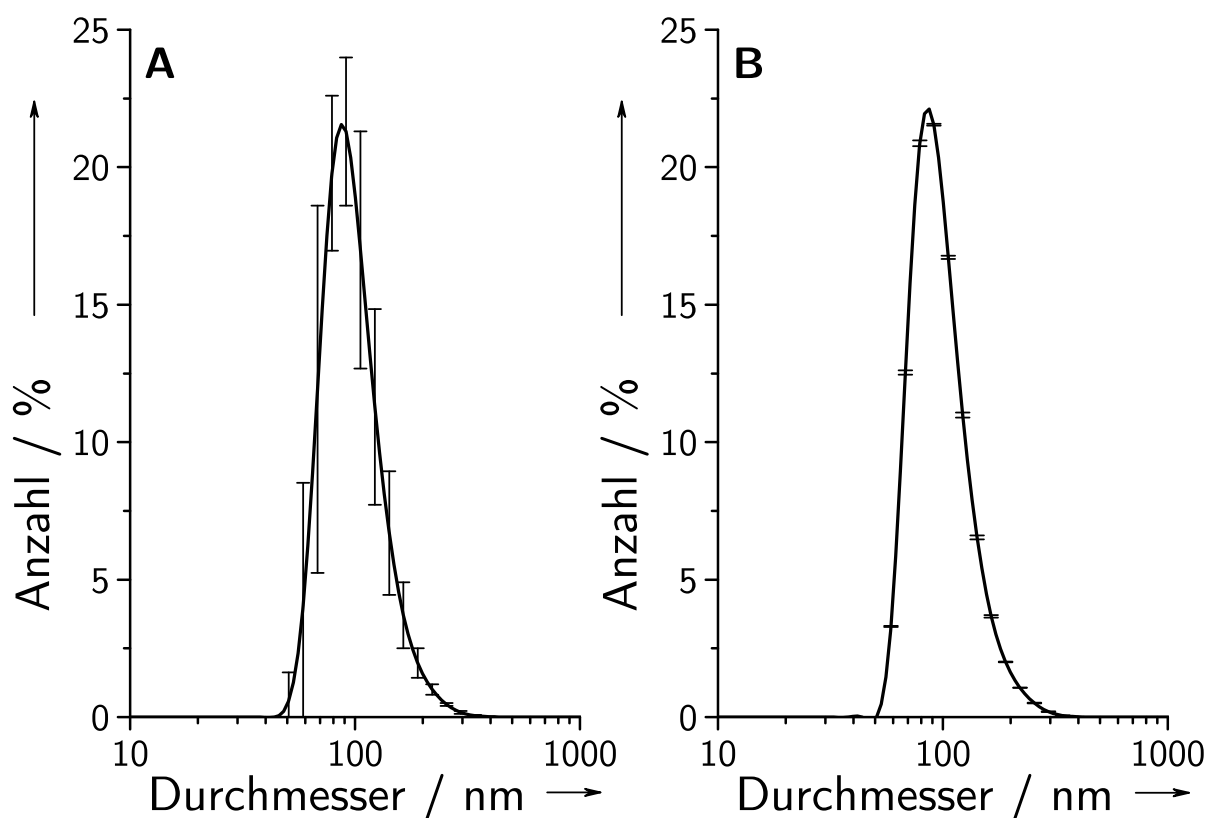
siebtägiger Lagerung bei -20 °C in Reinstwasser redispergiert ( $N=3$ ).

Ohne Trehalose und bei nur 10 mg mL<sup>-1</sup> Trehalose-Dihydrat konnten die Nanopartikel nicht redispergiert werden. Ab einer Trehalose-Konzentration von 20 mg mL<sup>-1</sup> wurden durch Zugabe von Reinstwasser wieder die ursprünglichen kolloidalen Dispersionen erhalten. Die Trehalosekonzentrationen im Bereich von 20 bis 60 mg mL<sup>-1</sup> zeigten dabei keinen signifikanten Einfluss auf die mittleren hydrodynamischen Durchmesser und den PDI nach der Gefriertrocknung und Redispergierung in Reinstwasser.

Das Zetapotential nahm mit steigender Trehalosekonzentration von -24 auf -18 mV ab. Die Polydispersitätsindizes lagen bei allen in Gegenwart von Trehalose gefriergetrockneten und redispergierten Dispersionen bei Werten < 0,2. Die kleinen PDI beschreiben das System als überwiegend monodispers. Für zellbiologische und mikrobiologische Untersuchungen wurden Dispersionen mit einer Trehalose-Dihydrat-Konzentration von 50 mg mL<sup>-1</sup> verwendet.

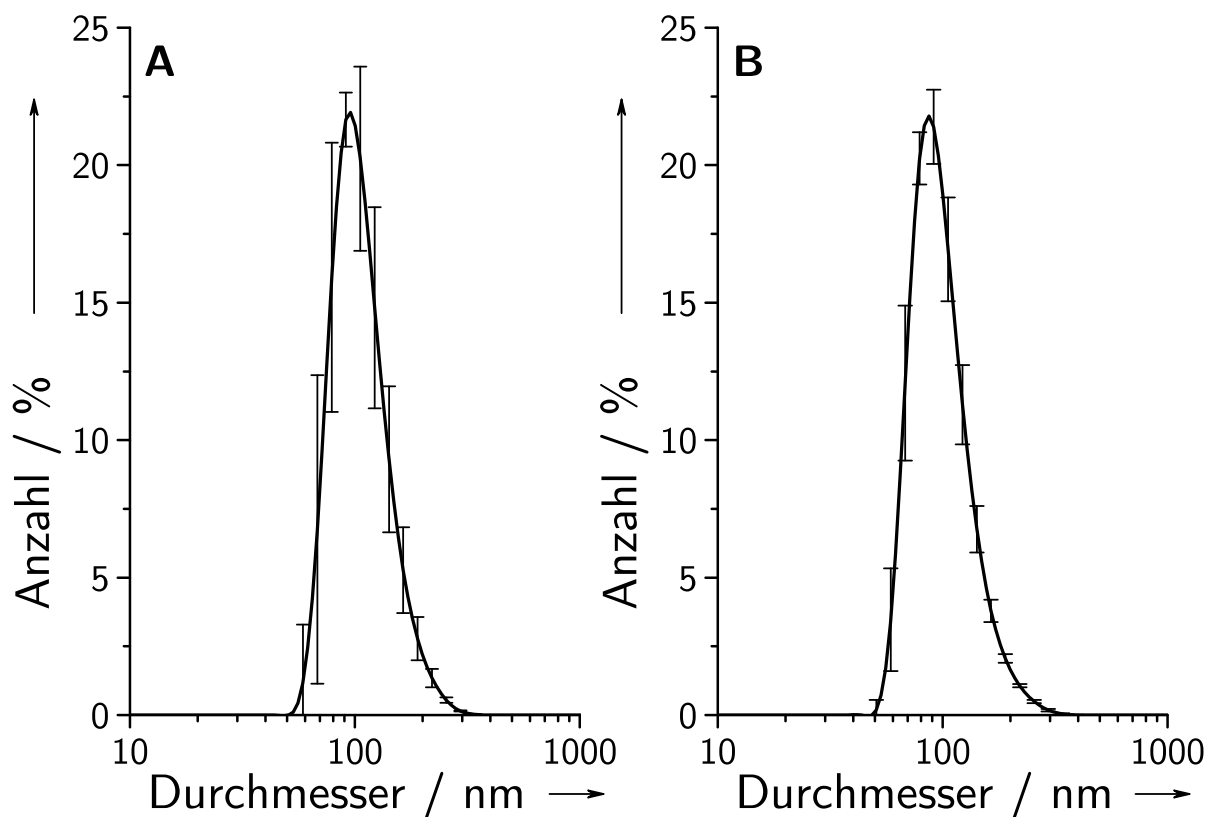


Die kolloidchemische Charakterisierung der mit  $50 \text{ mg mL}^{-1}$  Trehalose-Dihydrat versetzten Dispersionen mittels Dynamischer Lichtstreuung zeigte monodisperse und monomodale Größenverteilungen der undotierten und silberdotierten CMC-stabilisierten Calciumphosphat-Nanopartikel. In den Abbildungen 5.2 und 5.3 sind die gemittelten Größenverteilungen von jeweils drei unabhängigen Dispersionen vor (**A**) und nach (**B**) zweifacher Zentrifugation, Redispersion in Reinstwasser, Zugabe von  $50 \text{ mg mL}^{-1}$  Trehalose-Dihydrat und Sterilfiltration ( $0,2 \text{ }\mu\text{m}$  Spritzenvorsatzfilter) aufgetragen ( $N=3$ ).



**Abb. 5.2:** Größenverteilung (DLS) von undotierten CMC-stabilisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln vor (**A**) und nach (**B**) zweifacher Zentrifugation, Redispersion in Reinstwasser und Zugabe von  $50 \text{ mg mL}^{-1}$  Trehalose-Dihydrat.

Die Polydispersitätsindizes lagen bei allen Dispersionen bei Werten  $<0,150$ , was den monodispersen kolloidalen Charakter der Dispersionen belegt. Der Betrag des Zetapotentials der undotierten Carboxymethylcellulose-stabilisierten Calciumphosphat-Nanopartikel nahm mit  $-26,6 \pm 1,0 \text{ mV}$  vor ( $N=6$ ) und  $-21,2 \pm 0,9 \text{ mV}$  nach der Zentrifugation ( $N=3$ ) leicht ab.



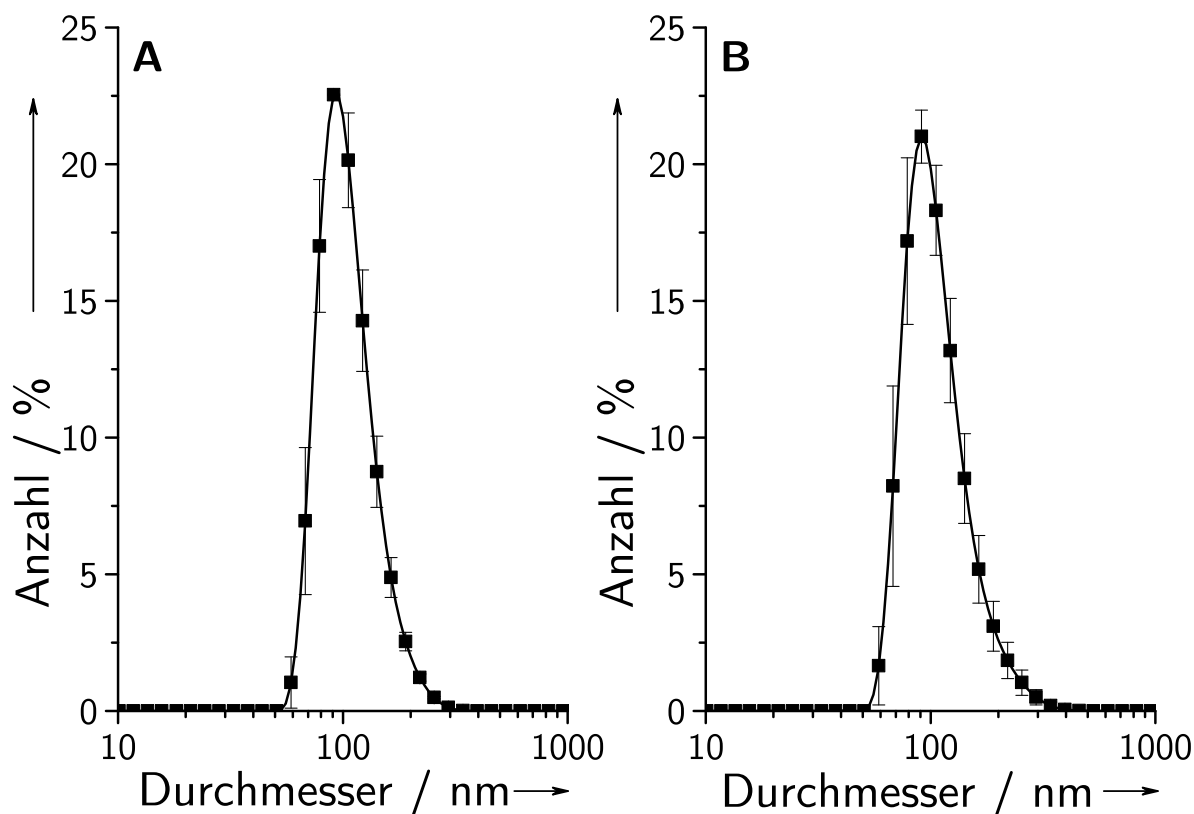
**Abb. 5.3:** Größenverteilung (DLS) von silberdotierten CMC-stabilisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln vor (A) und nach (B) zweifacher Zentrifugation, Redispersion in Reinstwasser, Zugabe von  $50 \text{ mg mL}^{-1}$  Trehalose-Dihydrat und Sterilfiltration ( $N=3$ ).

Der Betrag des Zetapotentials der silberdotierten Carboxymethylcellulose-stabilisierten Calciumphosphat-Nanopartikel nahm nach den Zentrifugationsschritten von  $-27,4 \pm 0,7 \text{ mV}$  ( $N=6$ ) auf  $-22,4 \pm 0,5 \text{ mV}$  ( $N=3$ ) leicht ab. Die Zugabe von Trehalose und die Sterilfiltration hatten keinen signifikanten Einfluss auf das Zetapotential der undotierten ( $-21,2 \pm 0,9 \text{ mV}$ ) und silberdotierten ( $-23,0 \pm 0,7 \text{ mV}$ ) Calciumphosphat-Nanopartikel ( $N=3$ ).

Die Abnahme des Zeta-Potentials kann durch die Änderung des pH-Werts bei der Redispersion in Reinstwasser erklärt werden. Die Fällung wurde bei  $\text{pH}=9$  durchgeführt. Der pH-Wert des Reinstwassers betrug 6,9. Die Carboxylfunktionen der CMC können bei  $\text{pH}=6,9$  zu einem größeren Maß protoniert werden als bei  $\text{pH}=9$ . Protonierte Carboxylfunktionen reduzieren die Gesamtladung des Polyelektrolyten.

Der monodisperse Charakter der undotierten und silberdotierten Calciumphosphat-Nanopartikel wurde auch nach der Gefriertrocknung und Redispersion erhalten. In Abbildung

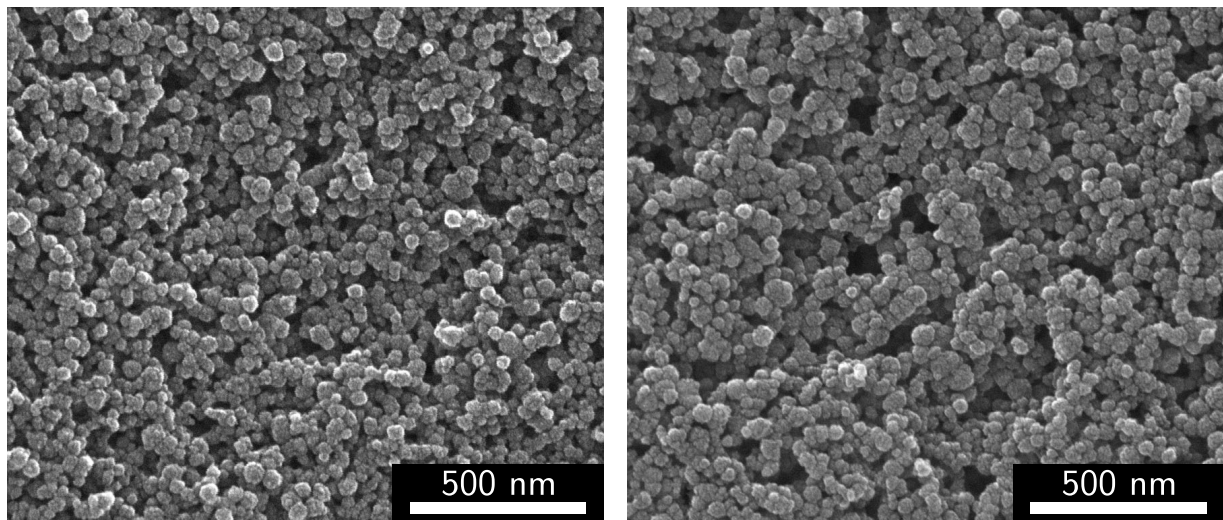
5.4 sind die gemittelten Größenverteilungen von jeweils drei unabhängigen Dispersionen undotierter (**A**) und silberdotierter (**B**) Calciumphosphat-Nanopartikel nach der Gefrier-trocknung und der Redispersion in Reinstwasser aufgetragen ( $N=3$ ).



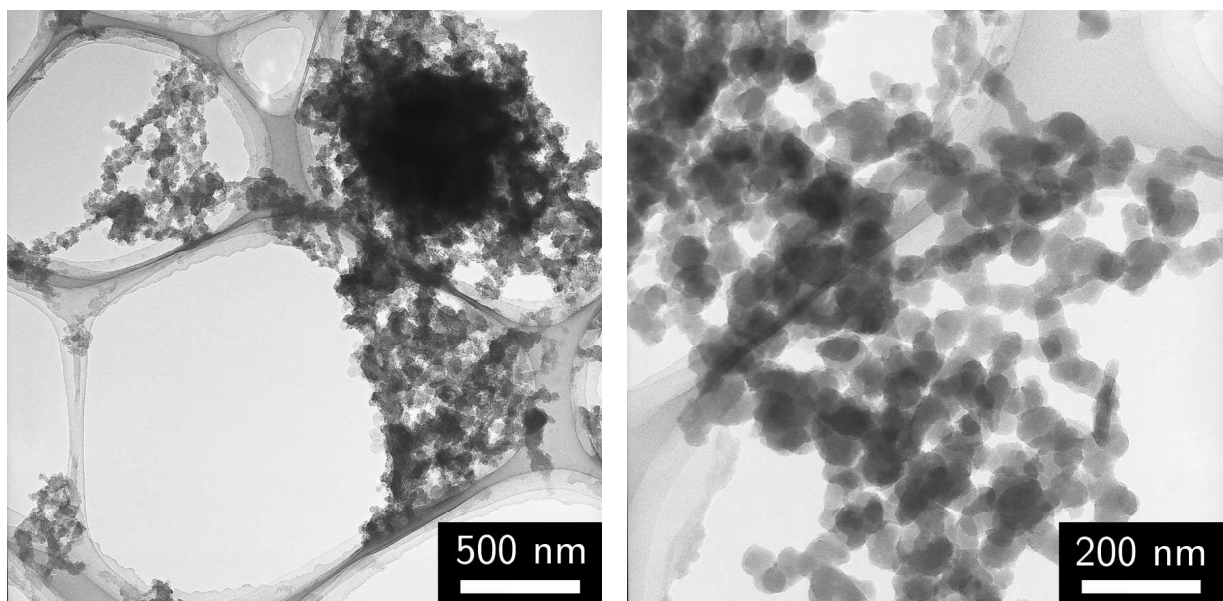
**Abb. 5.4:** Größenverteilung (DLS) von undotierten (**A**) und silberdotierten (**B**) CMC-stabilisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln nach der Gefriertrocknung und Redispersion in Reinstwasser ( $N=3$ ).

Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der zweifach zentrifugierten, undotierten und silberdotierten Calciumphosphat-Nanopartikel-Dispersionen ohne Zusatz von Trehalose nach der Trocknung an Luft bei Raumtemperatur sind in Abbildung 5.5 dargestellt. Die Aufnahmen zeigen durch den Trocknungsprozess hochgradig aggregierte, gleichförmige Nanopartikel kugelförmiger Gestalt. Die Kerndurchmesser der Calciumphosphat-Nanopartikel betragen zwischen 30 und 50 nm. Zwischen undotierten und silberdotierten Calciumphosphat-Nanopartikeln konnte kein Unterschied hinsichtlich des Kerndurchmessers und der Morphologie festgestellt werden.

In Abbildung 5.6 sind transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen von silberdotierten CaP-NP nach zweifacher Zentrifugation und Redispersion in Reinstwasser gezeigt.



**Abb. 5.5:** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen getrockneter undotierter (links) und silberdotierter (rechts) CMC-stabilsierter Calciumphosphat-Nanopartikel nach zweifacher Zentrifugation ohne Zugabe von Trehalose.



**Abb. 5.6:** Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen silberdotierter CMC-stabilsierter Calciumphosphat-Nanopartikel nach zweifacher Zentrifugation ohne Zugabe von Trehalose.

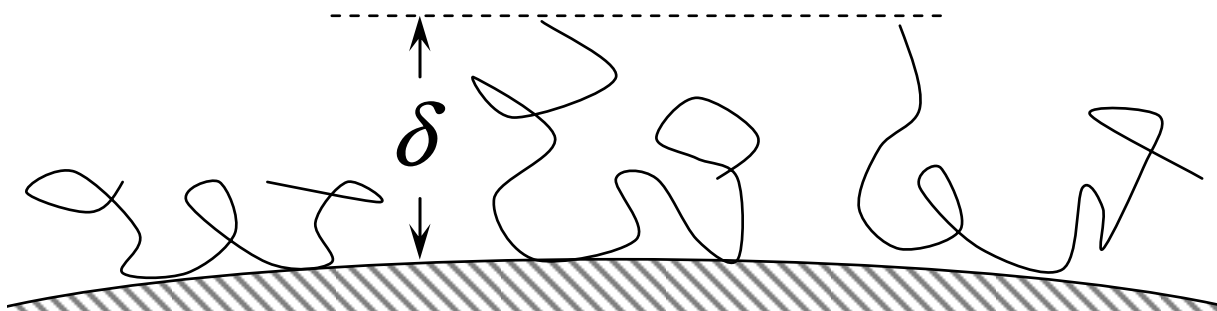
Es lassen sich deutlich kugelförmige Nanopartikel mit mittleren Durchmessern von 30 bis 50 nm erkennen.

Die Differenzen bei den ermittelten Durchmessern der Größenbestimmungen mittels Dynamischer Lichtstreuung (Größenverteilung nach der Anzahl) und Rasterelektronenmikroskopie betrugen zwischen 40 und 50 nm. Bei den elektronenmikroskopischen Aufnahmen

wird nur der anorganische Kern der Nanopartikel abgebildet. Die Dynamische Lichtstreuung erfasst den hydrodynamischen Durchmesser der Nanopartikel in Dispersion. Dieser setzt sich aus dem anorganischen Calciumphosphat-Kern und der gequollenen Hülle der Carboxymethylcellulose zusammen. Die gemittelten hydrodynamischen Durchmesser der Größenverteilungen (*z-average*, Größenverteilung nach der Intensität) liegen mit 130 bis 170 nm deutlich über den Maxima der Größenverteilungen nach der Anzahl. Dieser gemittelte Durchmesser (*z-average*) berücksichtigt im größeren Maße den Anteil aggregierter Partikel in der Dispersion. Das Streuvermögen von Partikeln ist proportional zur sechsten Potenz des Durchmessers, wodurch bei der Betrachtung der Intensitätsverteilungen nichtideal monodisperser Dispersionen grundsätzlich größere Durchmesser ermittelt werden. Die aus den Größenverteilungen nach der Intensität ermittelten PDI belegen den monodispersen Charakter und den geringen Aggregationsgrad der Carboxymethylcellulose-stabilisierten Calciumphosphat-Nanopartikel-Dispersionen. Der größere hydrodynamische Durchmesser lässt sich auf die Konformation und das Adsorptionsverhalten der Carboxymethylcellulose zurückführen.

Die Konformationen von Carboxymethylcellulosen in wässriger Elektrolyten sind komplex.<sup>[261,338,339]</sup> In verdünnten Lösungen liegen Carboxymethylcellulosen mehr oder weniger gestreckt vor und lassen sich als „*worm-like chain*“ beschreiben. Die Konformation ist dabei gestreckt, da die  $\beta$ -1 $\rightarrow$ 4-glykosidische Bindung zwischen den Glukoseeinheiten ein steifes Molekülgerüst bewirkt.<sup>[340]</sup> Die Ladungen der Carboxylfunktionen liefern zusätzlich einen repulsiven Betrag. Die negativ geladenen Molekülfragmente und Moleküle untereinander stoßen sich dabei gegenseitig ab. Die Persistenzlängen von CMC-Molekülen liegen im Bereich von 16 nm.<sup>[256,261]</sup> Je nach Konzentration, Ionenspezies, Ionenstärke, mittlere Kettenlänge des Moleküls, Substitutionsgrad und Temperatur können CMCs darüber hinaus geknäulte oder aggregierte Strukturen in wässrigen Elektrolyten ausbilden.<sup>[261,338]</sup> Durch die Kondensation von Gegenionen können mehrere Carboxylgruppen elektrostatische Wechselwirkungen mit Ionen eingehen und die Konformation des Moleküls verändern.<sup>[341,342]</sup> Die Wechselwirkung mit mehrwertigen Kationen wie  $\text{Ca}^{2+}$  führt zu geknäulten Strukturen oder zur Gelbildung.<sup>[338,343]</sup>

Die Wechselwirkungen zwischen CMC und Partikeloberflächen sind ebenfalls komplex. Bei der Synthese von Calciumphosphat-Nanopartikeln hemmt CMC das weitere Partikelwachstum am Ende des Rohrreaktors und stabilisiert die Nanopartikel. Calciumionen können dabei elektrostatische Wechselwirkungen mit CMC eingehen und die Konformation des CMC-Moleküls verändern.<sup>[338,343]</sup> Polyelektrolyte zeigen häufig bei Adsorption an Oberflächen in Gegenwart hoher Salzkonzentrationen eine stark gequollene Konformation.<sup>[344]</sup>



**Abb. 5.7:** Mögliche Konformationen adsorbierter Polyelektrolyt-Moleküle auf einer Nanopartikeloberfläche. Die hydrodynamische Dicke der Polyelektrolythülle wird durch in das Dispersionsmittel ragende Schleifen und Enden der Polymerkette bestimmt.

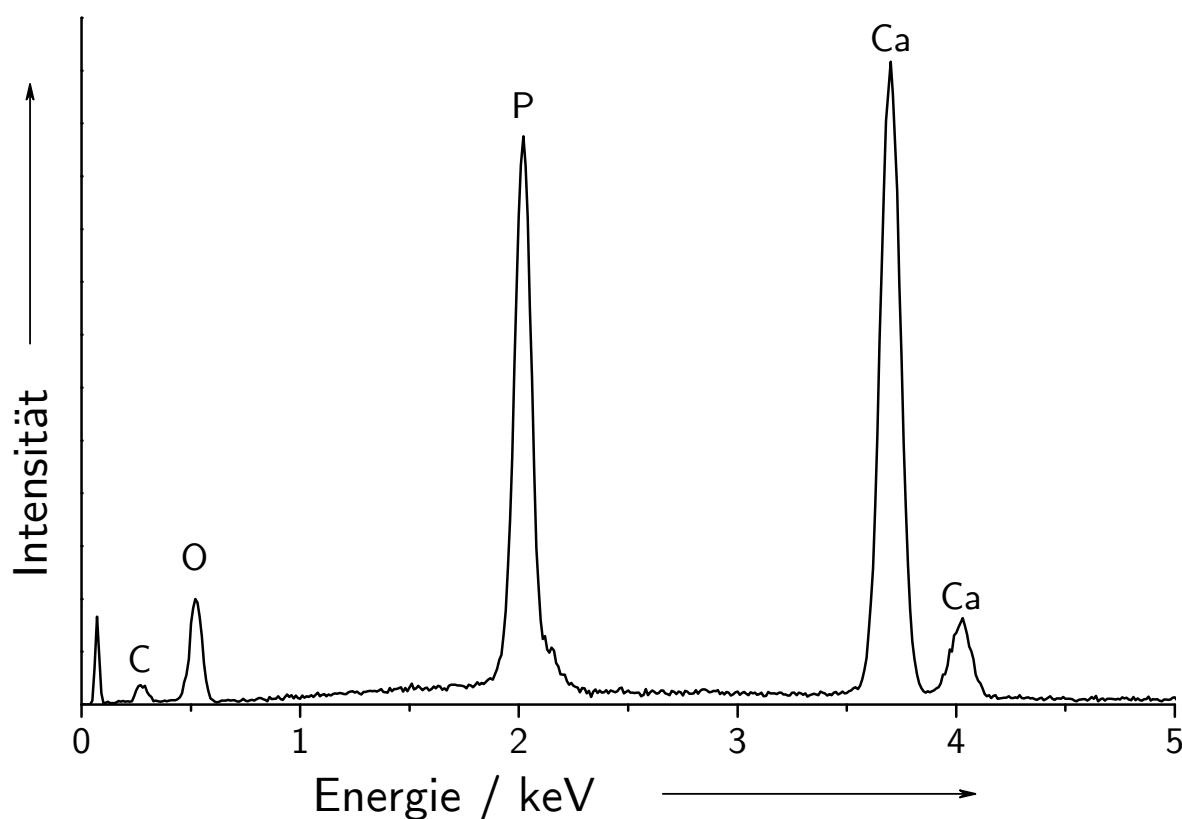
Die in der Regel an Partikeloberflächen beobachtete flache Konformation von CMC trifft aufgrund der Kondensation von  $\text{Ca}^{2+}$  entlang der Polymerkette wahrscheinlich nicht zu.<sup>[345]</sup> Hoogendam *et al.* untersuchten die Wechselwirkungen zwischen CMC unterschiedlicher Molmassen und Substitutionsgrade mit Nano- und Mikropartikeln. Das Adsorptionsverhalten an und die sich ausbildenden Dicken der Polyelektrolytschichten auf Partikeloberflächen zeigte überraschende Abhängigkeiten.<sup>[346,347]</sup> Es zeigte sich, dass die Dicke der im Dispersionsmittel gequollenen Hülle aus CMC nicht unbedingt mit der Menge an adsorbierter CMC und der mittleren Molmasse korreliert. Bei hohen CMC-Konzentrationen adsorbieren überwiegend längere CMC-Moleküle an der Oberfläche. Kürzere CMC-Moleküle werden verdrängt. Die mit der DLS gemessene hydrodynamische Dicke der Polyelektrolytschicht ( $\delta$ ) lässt sich durch wenige in das umgebende Dispersionsmittel ragende Polymerschlaufen und Polymerenden erklären (Abbildung 5.7).<sup>[348,349]</sup>

Bei der Messung des hydrodynamischen Durchmessers in Lichtstreuexperimenten muss die Viskosität des Löse- oder Dispersionsmittels definiert werden. Die effektive Viskosität einer Polyelektrolytlösung oder einer Polyelektrolyt-stabilisierten Nanopartikel-Dispersion weicht von der Viskosität des reinen Löse-/Dispersionsmittels ab.<sup>[346,347]</sup> Die Bestimmung des hydrodynamischen Durchmessers von Calciumphosphat-Nanopartikeln wurde unter der Annahme der Viskosität von reinem Wasser durchgeführt. Unter Berücksichtigung einer höheren effektiven Viskosität in der Dispersion werden entsprechend Gleichung 3.4 in Abschnitt 3.9.1 kleinere mittlere Durchmesser erhalten. Da die effektiven Viskositäten der Dispersionen nicht bekannt waren, wurde eine Neuberechnung der Durchmesser nicht durchgeführt.

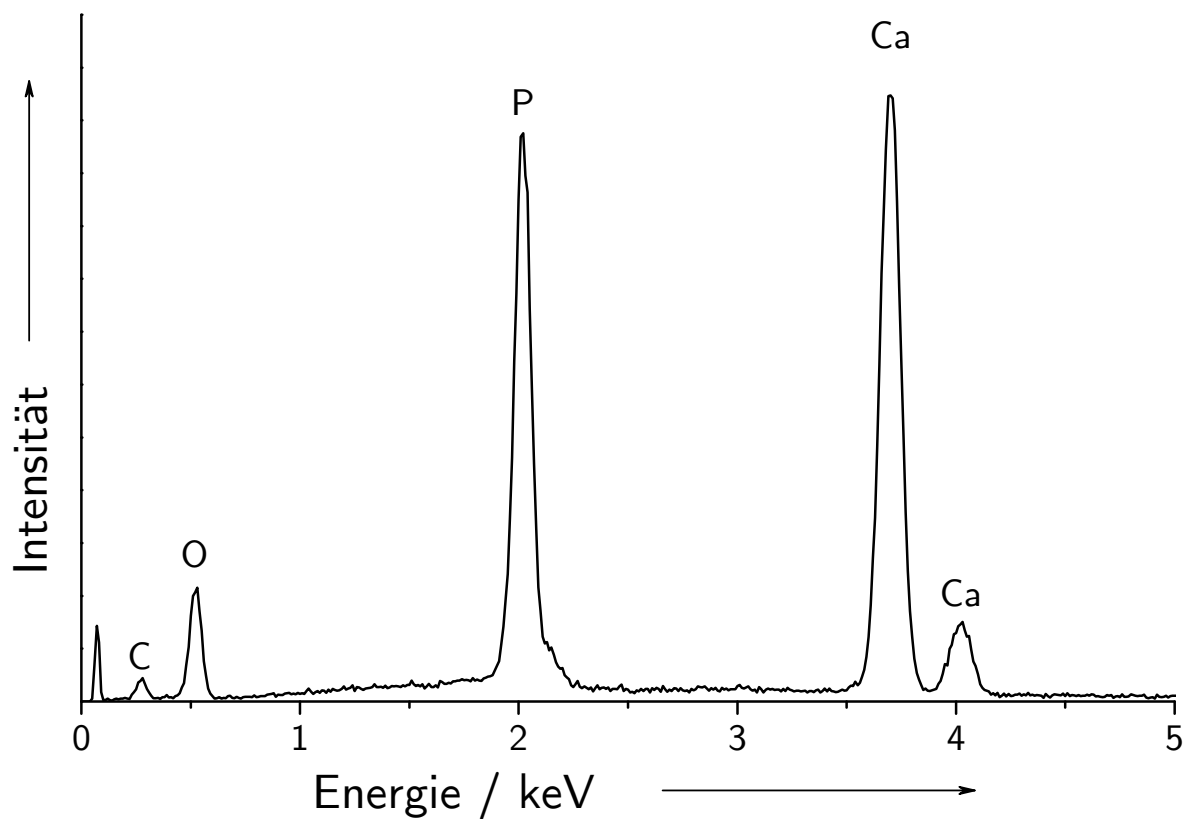
Kamburova *et al.* ermittelten eine hydrodynamische Dicke der Hülle von CMC ( $M_w = 2,5 \cdot 10^5 \text{ g mol}^{-1}$ , Substitutionsgrad=1,2) mit 6 bis 7 nm auf der Oberfläche von Magnetit-

Nanopartikeln.<sup>[350]</sup> Phenrat *et al.* bestimmten die Dicke von adsorbierter CMC ( $M_w = 2,5 \cdot 10^5 \text{ g mol}^{-1}$ , Substitutionsgrad=1,2) auf Magnetit-Nanopartikeln in wässriger Dispersion mit 7 nm.<sup>[348]</sup> Hoogendam *et al.* beobachteten ungewöhnlich dicke Schichten von CMC unterschiedlicher mittlerer Molmassen nach der Adsorption auf  $\text{TiO}_2$ - und Latex-Partikeln (10 bis 50 nm).<sup>[256,346,347]</sup> Pearce *et al.* zeigten, dass CMC eine hohe Affinität zu Hydroxylapatit besitzt. Bei der Adsorption von CMC an der Hydroxylapatitoberfläche löst CMC Calciumionen aus der Kristalloberfläche. Dabei steigt die Menge an Phosphationen in der Lösung an.<sup>[351]</sup>

Die genaue Ursache für die ungewöhnlich dicke Schicht der CMC auf der Oberfläche der Calciumphosphat-Nanopartikel lässt sich aufgrund der vielen Einflussgrößen nicht klären. Die nach der Redispersion in Reinstwasser gemessenen kleineren hydrodynamischen Durchmesser können mit der Vereinzelung aggregierter Nanopartikel zusammenhängen. Der große Energieeintrag durch den Ultraschalldisperser kann auch zu Brüchen in der Polymerkette der CMC führen.<sup>[339]</sup>



**Abb. 5.8:** Energiedispersives Röntgenspektrum von undotierten CMC-stabilisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln nach der Trocknung an Luft.

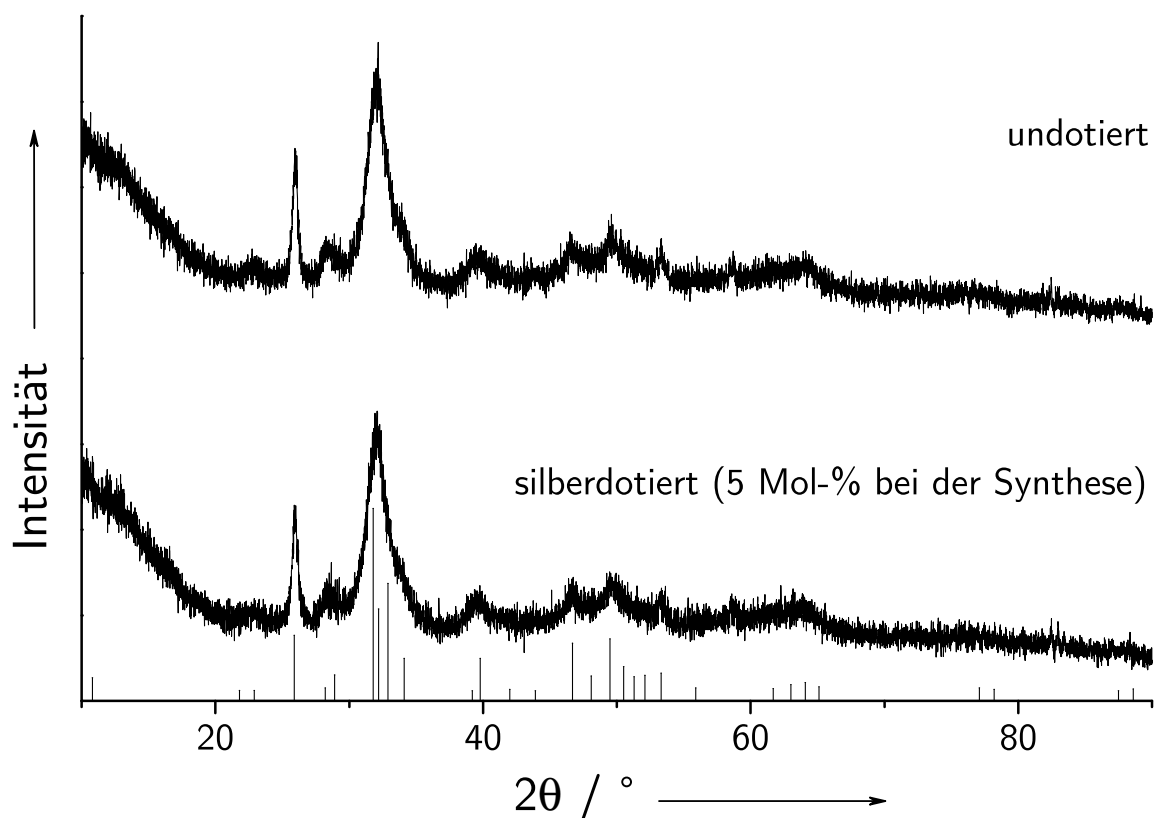


**Abb. 5.9:** Energiedispersives Röntgenspektrum von silberdotierten CMC-stabilisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln nach der Trocknung an Luft.

Die Behandlung mit Ultraschall während der Redispersion der CaP-NP kann so die Länge der adsorbierten CMC-Moleküle verkürzen. Die mittleren hydrodynamischen Durchmesser werden kleiner.

Energiedispersive Röntgenspektroskopie der undotierten und silberdotierten CMC-stabilisierten Calciumphosphat-Nanopartikel zeigte keine signifikanten Unterschiede in den elementaren Zusammensetzungen. Die Signale von Kohlenstoff, Sauerstoff, Phosphor und Calcium wurden in beiden Partikelsystemen detektiert. Die silberdotierten Calciumphosphat-Nanopartikel zeigten kein Signal für Silber. Die Nachweisgrenze der EDX liegt im Bereich von 0,5 bis 1 %, so dass geringere Silbergehalte nicht detektiert werden können. Die Stoffmengenverhältnisse von Calcium zu Phosphor betrugen  $1,533 \pm 0,001$  für die undotierten und  $1,554 \pm 0,026$  für die silberdotierten Calciumphosphat-Nanopartikel ( $N=3$ ). In beiden Fällen sind die Zusammensetzungen calciumdefizitär in Bezug auf stöchiometrischen Hydroxylapatit mit einem Verhältnis von Calcium zu Phosphor von 1,667. Die EDX-Spektren sind in den Abbildungen 5.8 und 5.9 dargestellt.

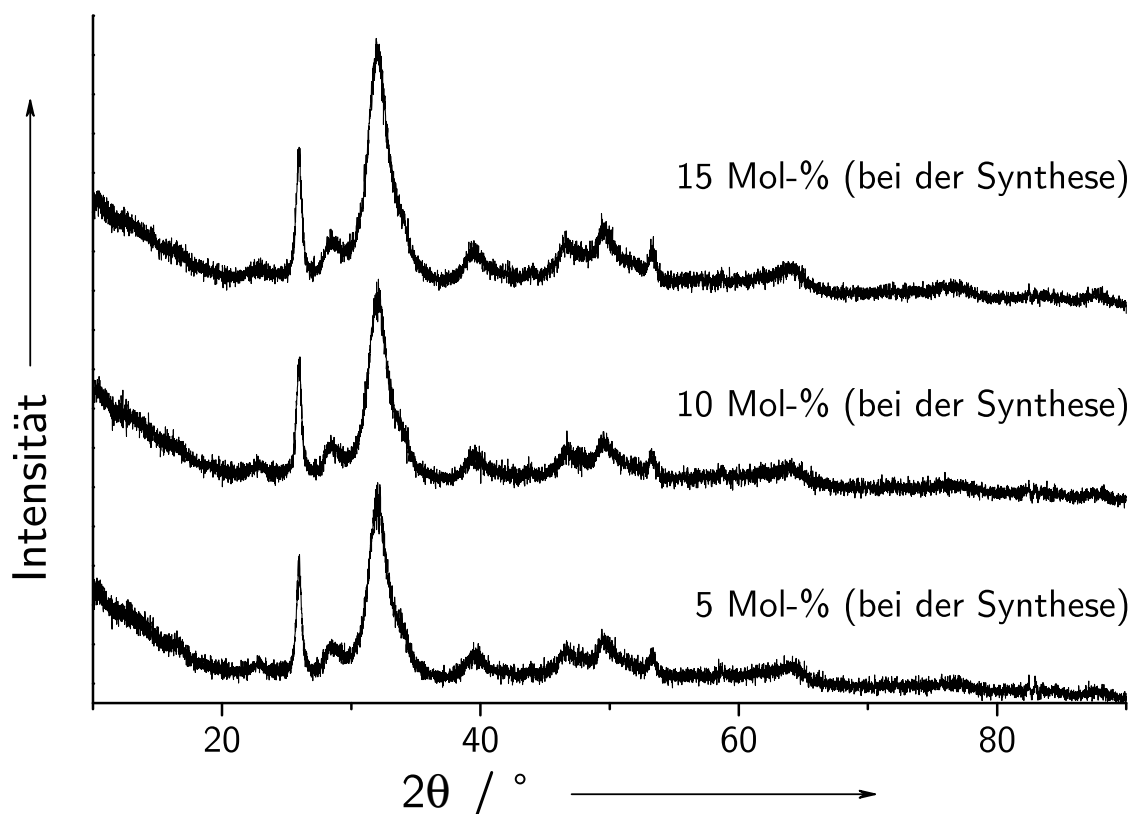




**Abb. 5.10:** Pulverdiffraktogramme der undotierten (oben) und silberdotierten (unten) CMC-stabilisierten Calciumphosphat-Nanopartikel nach Trocknung an Luft. Die vertikalen Linien geben Referenzreflexe von Hydroxylapatit an.<sup>[352]</sup>

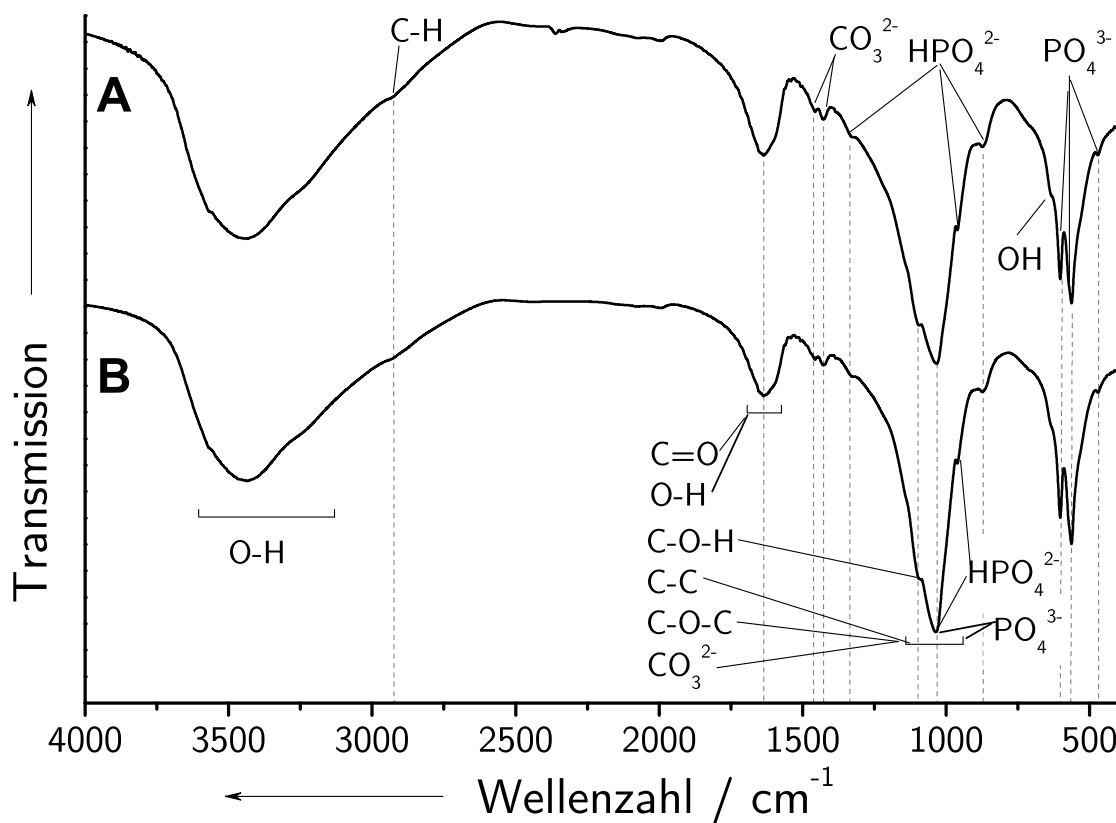
Pulverdiffraktometrische Untersuchungen zeigten keine Unterschiede zwischen silberdotierten und undotierten Carboxymethylcellulose-stabilisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln. In allen Diffraktogrammen konnten Reflexe von nanokristallinem Hydroxylapatit beobachtet werden (Abbildung 5.10). Auch eine Steigerung der Silberkonzentration von 5 Mol-% auf 15 Mol-% Silber, bezogen auf Calcium während der Synthese, zeigte keine Veränderung der Intensitäten und Lagen der Beugungsreflexe (Abbildung 5.11). Die Gitterkonstanten betrugen  $a = 9,454 \pm 0,003 \text{ \AA}$  und  $c = 6,860 \pm 0,002 \text{ \AA}$  bei 5 Mol-% Silber,  $a = 9,450 \pm 0,003 \text{ \AA}$  und  $c = 6,855 \pm 0,002 \text{ \AA}$  bei 10 Mol-% Silber und  $a = 9,461 \pm 0,003 \text{ \AA}$  und  $c = 6,864 \pm 0,002 \text{ \AA}$  bei 15 Mol-% Silber. Die Volumina der Elementarzellen betrugen  $V = 531,0 \pm 3 \text{ \AA}^3$  (5 Mol-% Silber),  $V = 530,2 \pm 3 \text{ \AA}^3$  (10 Mol-% Silber) und  $V = 532,0 \pm 0,3 \text{ \AA}^3$  (15 Mol-% Silber). Die mit der Rietveld-Methode ermittelte Domänengröße der Kristallite lag bei ca. 10 nm.

Fourier-Transformations-Infrarotspektren der zweifach zentrifugierten und an Luft getrockneten undotierten und silberdotierten CMC-stabilisierten Calciumphosphat-Nano-



**Abb. 5.11:** Pulverdiffraktogramme silberdotierter CMC-stabilsierter Calciumphosphat-Nanopartikel nach der Synthese mit unterschiedlichen Silbergehalten.

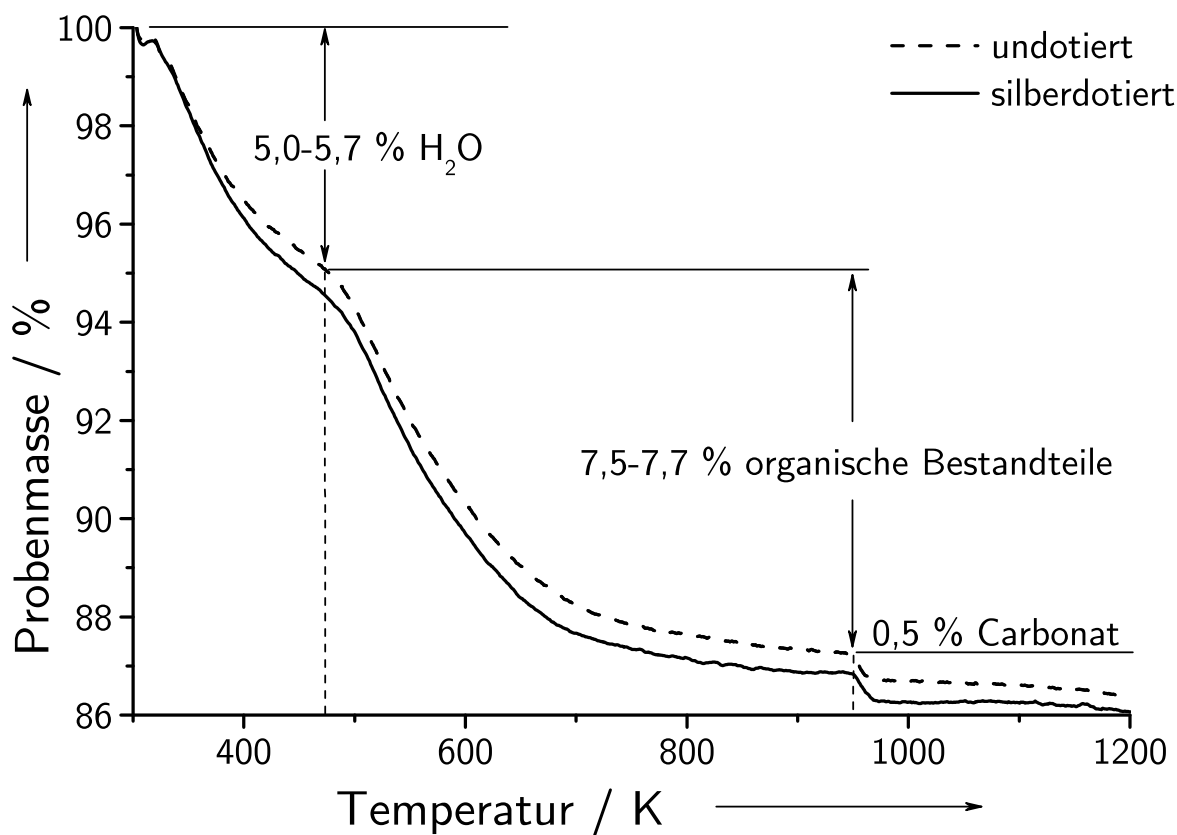
partikel sind in Abbildung 5.12 gezeigt. Es lassen sich die charakteristischen Banden der Phosphat- und Hydrogenphosphat-Valenzschwingungen ( $868$ ,  $958$ ,  $1040$ ,  $1096$ ,  $1330\text{ cm}^{-1}$ ) erkennen.<sup>[353,354]</sup> Die Banden mit der Wellenzahl  $1635\text{ cm}^{-1}$  können adsorbiertem Wasser zugeordnet werden. In diesem Bereich können auch die Valenzschwingungen von Carbonylgruppen  $\text{C}=\text{O}$  der Carboxymethylcellulose auftreten.  $\text{C}-\text{H}$ - und  $\text{C}-\text{O}$ -Schwingungen des Glukoserückgrats der Carboxymethylcellulose treten typischer Weise im Bereich von  $950$  bis  $1100\text{ cm}^{-1}$  auf. Die Schulter bei  $2924\text{ cm}^{-1}$  kann der  $\text{C}-\text{H}$ -Streckschwingung der  $\text{CH}_2$ -Gruppen der Carboxymethylcellulose zugeordnet werden. Im Bereich von  $1350$  bis  $1450\text{ cm}^{-1}$  treten Deformationsschwingungen von  $\text{C}-\text{O}-\text{H}$ - und von  $\text{CH}_2$ -Gruppen auf. Streckschwingungen primärer Alkohole und Drehschwingungen von  $\text{CH}_2$ -Gruppen liegen mit  $1020$  bis  $1080\text{ cm}^{-1}$  im Bereich der Phosphatschwingungen.<sup>[345]</sup> Die genaue Zuordnung ist aufgrund der dominaten Phosphatbanden insbesondere im Bereich von  $900$  bis  $1100\text{ cm}^{-1}$  kaum möglich. Infrarot-Spektren von Carboxymethylcellulose zeigen ebenfalls in diesem Bereich eine starke Extinktion.<sup>[345,355,356]</sup>



**Abb. 5.12:** Infrarotspektren von CMC-stabilisierten undotierten (A) und silberdotierten (B) Calciumphosphat-Nanopartikeln nach Trocknung an Luft.

Die thermogravimetrische Analysen von den bei Raumtemperatur an Luft getrockneten, zweifach zentrifugierten undotierten und silberdotierten Calciumphosphat-Nanopartikeln unterscheiden sich kaum (Abbildung 5.13). Nach der Trocknung betrug der Wasseranteil beider Systeme 5,0 bis 5,7 %. Der Anteil an organischen Bestandteilen betrug zwischen 7,5 und 7,7 %. Der durch gelöstes  $\text{CO}_2$  aus der Luft eingetragene Carbonatanteil betrug in beiden Systemen 0,5 %. Der mit der Elementaranalyse bestimmte Anteil an Kohlenstoff wurde zur Berechnung des Anteils an Carboxymethylcellulose herangezogen.

Für die undotierten CaP-NP wurde ein Kohlenstoffanteil von  $2,76 \pm 0,03$  % und für die silberdotierten CaP-NP ein Kohlenstoffanteil von  $2,75 \pm 0,02$  % bestimmt. Bezogen auf den Massenanteil von Kohlenstoff pro Anhydroglukoseeinheit ( $M_w = 202,06 \text{ g mol}^{-1}$ , Carboxylatform) der Carboxymethylcellulose errechnen sich die Anteil entsprechend der Gleichungen 5.3 und 5.4.



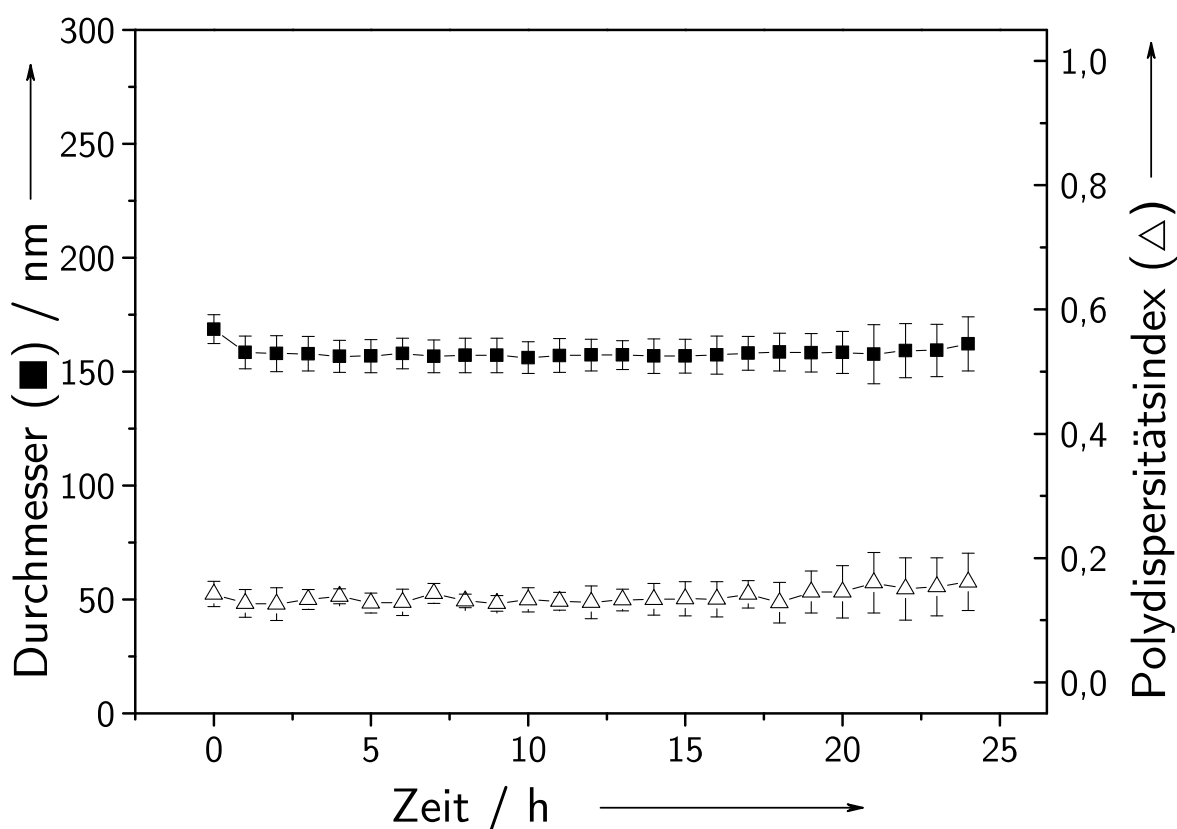
**Abb. 5.13:** Thermogramme von undotierten (gestrichelte Linie) und silberdotierten (durchgezogene Linie) CMC-stabilisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln nach Trocknung an Luft.

$$w = 2,76 \cdot \frac{202,06 \text{ g mol}^{-1}}{88,88 \text{ g mol}^{-1}} = 6,3 \% \text{ (undotiert)} \quad (5.3)$$

$$w = 2,75 \cdot \frac{202,06 \text{ g mol}^{-1}}{88,88 \text{ g mol}^{-1}} = 6,3 \% \text{ (silberdotiert)} \quad (5.4)$$

Die mit der Thermogravimetrie abgeschätzten prozentualen Anteile organischer Bestandteile liegen mit 7,5 bis 7,7 % um 1,2 bis 1,4 % über den der mittels CHNS-O-Analyse bestimmten Anteilen. Die relative erweiterte Messunsicherheit der Bestimmung von Kohlenstoff mittels der Elementaranalyse wird mit 1 % angegeben und kann die Abweichung nicht erklären. Die Thermogravimetrie hingegen lässt keine exakte Bestimmung des Anteils organischer Bestandteile zu. Die klare Abgrenzung des Wasseranteils und des Anteils organischer Bestandteile ist aufgrund der nicht sehr scharfen Stufe im Heizprofil bei 490 K nicht möglich.

Die Stabilität von CMC-stabilisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln wurde in RPMI-Zellkulturmedium mit Zusatz von 10% (V/V) fetalem Kälberserum bestimmt. Die in einer Trehalosematrix gefriergetrockneten Calciumphosphat-Nanopartikel wurden dazu in dem Medium über 24 Stunden bei 37 °C in einer Messküvette inkubiert. Die hydrodynamischen Durchmesser und die Polydispersitätsindizes wurden stündlich gemessen. Das Medium wurde dazu entsprechend der biologischen Experimente zu 10 % (V/V) verdünnt. Die gemittelten hydrodynamischen Durchmesser der Intensitätsverteilungen (*z-average*) von fünf unabhängigen Proben und die zugehörigen Polydispersitätsindizes sind in Abbildung 5.14 in Abhängigkeit von der Zeit aufgetragen.



**Abb. 5.14:** Stabilität von CMC-stabilisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln in RPMI-Medium mit 10 % (V/V) FCS. Die in einer Trehalosematrix gefriergetrockneten Nanopartikel wurden in Reinstwasser redispergiert und in RPMI mit 10 % FCS für 24 Stunden bei 37 °C inkubiert ( $N=5$ ).

Die gemittelten hydrodynamischen Durchmesser der Intensitätsverteilungen liefern ein gutes Maß zur Abschätzung der kolloidalen Stabilität. Durch die Proportionalität des Streuvermögens mit der sechsten Potenz des Durchmessers werden insbesondere große Partikel und Aggregate stärker gewichtet als kleine Partikel. <sup>[357]</sup>

**Tab. 5.2:** Stabilität von silberdotierten CMC-stabilisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln in RPMI mit 10 % FCS. Die mittleren hydrodynamischen Durchmesser (*z-average*, *d*) und Polydispersitätsindizes wurden mit der Dynamischen Lichtstreuung ermittelt (*N*=5).

	0 h		24 h	
	<i>d</i> / nm	PDI	<i>d</i> / nm	PDI
RPMI + 10 % FCS	149 ± 7	0,140 ± 0,014	152 ± 5	0,127 ± 0,011

Eine geringfügige Aggregation von Nanopartikeln führt unmittelbar zu größeren hydrodynamischen Durchmessern.<sup>[307]</sup> Im Rahmen der einfachen Standardabweichung konnte keine signifikante Größenänderung der Calciumphosphat-Nanopartikel während der Inkubation in den biologischen Medien beobachtet werden. Die ermittelten Mittelwerte (*z-average*) der Intensitätsverteilungen zu Beginn und am Ende der Inkubation sind in Tabelle 5.2 aufgeführt ( $x \pm \sigma$ ). In RPMI mit 10 % FCS (*V/V*) lagen die Nanopartikel über die gesamte Inkubationsdauer monodispers vor. Die Charakterisierungsergebnisse der undotierten und silberdotierten CMC-stabilisierten Calciumphosphat-Nanopartikel sind in Tabelle 5.3 zusammengefasst.

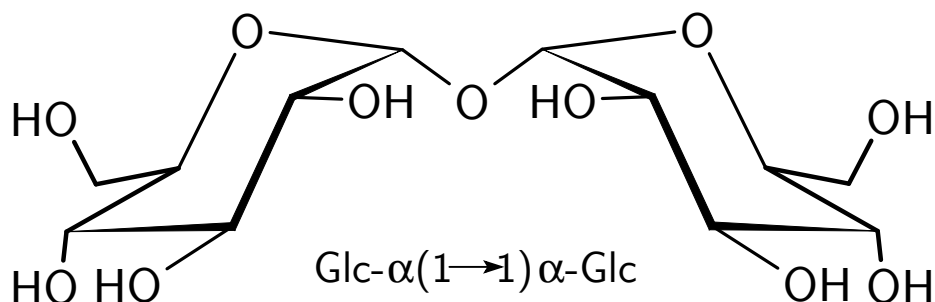
Der geringe Silbergehalt von  $0,39 \pm 0,01$  % lässt sich unter anderem auf eine unvollständige Substitution der Calcium-Gitterplätze durch Silberionen im Hydroxylapatit erklären. Eine vollständige Substitution von 5 Mol-% würde unter der Annahme, dass die Calciumphosphat-Nanopartikel ausschließlich aus Hydroxylapatit bestehen, etwa zu einer Zusammensetzung der Form  $(\text{Ca}_{9,5}\text{Ag}_{0,5}(\text{PO}_4)_{5,85}(\text{OH})_{1,95})$  führen. Die Adsorption von Silber an den Calciumphosphat-Nanopartikeln und der Einbau von Silber in das Kristallgitter von Calciumphosphat-Nanopartikeln ist sehr gering. Dies kann unter anderem an den komplexierenden Eigenschaften der CMC liegen. Die chelatisierenden Eigenschaften von CMC gegenüber multivalenten Metallkationen sind bekannt und werden technisch in Ionenaustauschern eingesetzt.<sup>[358]</sup> Carboxymethylcellulose komplexiert auch monovalente Silberionen durch elektrostatische Wechselwirkungen der Carboxylfunktionen, so dass die Aktivität von Silberionen in Gegenwart von Carboxymethylcellulose stark vermindert ist.<sup>[359–363]</sup> Silberionen bilden darüber hinaus starke Diamminkomplexe der Form  $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$ .<sup>[364,365]</sup> Bei der Synthese der Calciumphosphat-Nanopartikel wurden die pH-Werte der Ausgangslösungen mit Ammoniak auf pH=9 eingestellt. Dadurch könnte ein Großteil des Silbers nicht in das Kristallgitter eingebaut werden, sondern als Diamminkomplex in Lösung verblieben sein.

**Tab. 5.3:** Zusammenfassung der Eigenschaften der undotierten und der silberdotierten CMC-stabilisierten Calciumphosphat-Nanopartikel.

	undotierte Calciumphosphat-Nanopartikel	silberdotierte Calciumphosphat-Nanopartikel
$d$ (REM/TEM) / nm	50 – 60	50 – 60
$d$ ( $z$ -average, DLS) / nm	$143 \pm 4$	$138 \pm 6$
$d$ (Maximum, DLS) / nm	94	93
PDI (DLS)	$0,099 \pm 0,029$	$0,088 \pm 0,017$
$\zeta$ (DLS) / mV	$-23 \pm 2$	$-25 \pm 1$
Ag / %	–	$0,39 \pm 0,01$
Ca / %	$31,40 \pm 0,41$	$31,60 \pm 0,16$
P / %	$48,40 \pm 0,04$	$48,60 \pm 0,08$
C / %	2,76	2,75
H / %	1,42	1,40
Ca : P / ( $n : n$ )	$1,539 \pm 0,038$	$1,543 \pm 0,008$
(Ag + Ca) : P / ( $n : n$ )	–	$1,550 \pm 0,008$
flüchtiger Anteil (TG) / %	13,0	13,9

Die wässrigen Dispersionen der Calciumphosphat-Nanopartikel zeigten je nach Konzentration nach wenigen Stunden eine deutliche Tendenz zur Koagulation. In Gegenwart des Kryoprotektors Trehalose konnten die Nanopartikel jedoch aus wässriger Dispersion mittels Gefriertrocknung entwässert und als Feststoff dauerhaft gelagert werden. Durch Zusatz von Wasser konnte das feste Kolloid wieder in Dispersion überführt werden.

Mikroorganismen enthalten häufig Disaccharide oder Polysaccharide, welche die Zellmembranen und Proteine beim Dehydrieren und Einfrieren stabilisieren. Dabei interagieren die Zuckermoleküle mit Phospholipiden der Zellmembranen und mit Proteinen, wobei deren Struktur und Konformation stabilisiert wird.<sup>[366–375]</sup> Monosaccharide wie Glucose und Disaccharide wie Mannitol, Saccharose und Trehalose eignen sich auch als Kryo- und Lyoprotektoren von Calciumphosphat-Nanopartikel-Dispersionen.



**Abb. 5.15:** Strukturformel von Trehalose (1- $\alpha$ -Glucopyranosyl-1- $\alpha$ -glucopyranosid).<sup>[368]</sup>

Eine besondere Stellung nimmt dabei Trehalose ein (Abbildung 5.15).<sup>[376]</sup> Ähnlich wie in Mikroorganismen wird ein stabilisierender Einfluss der Saccharide beim Einfrieren von Nanopartikeln vermutet. Die Wirkung wird der Wechselwirkung zwischen Zuckermolekülen und polaren Gruppen an der Oberfläche von Makromolekülen (Polyelektrolyten, Proteine) und Nanopartikeln zugeschrieben.<sup>[377]</sup> Oku *et al.* beschrieben die Komplexierung von Calciumionen durch Trehalose in wässriger Lösung.<sup>[378]</sup> Diese Komplexe könnten einen stabilisierenden Effekt auf die gefriergetrockneten Calciumphosphat-Nanopartikel zeigen. Mit zunehmender Trehalosekonzentration beim Entwässern von Nanopartikel-Dispersionen steigt die Glasübergangstemperatur des Trehalose-Wasser-Gemisches steil an. Der Zustand der erstarrten Flüssigkeit bleibt bei geringem Wassergehalt <10 % auch bei Raumtemperatur erhalten.<sup>[379,380]</sup> Während der Gefriertrocknung entsteht eine Trehalose-Dihydrat-Matrix, in der Nanopartikel eingebettet sind. In dieser Matrix sind die Nanopartikel im festen Zustand kolloidal fixiert und lassen sich über längere Zeit bei Raumtemperatur lagern.

Die Freisetzung von Silberionen aus silberdotierten CMC-stabilisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln wurde in Reinstwasser (pH=6,9) bei Raumtemperatur untersucht (Abschnitt 3.15). Die Silberfreisetzung ist in Tabelle 5.4 zusammengefasst. In der ersten Stunde wurden > 30 % des Silbers in das Dispersionsmittel freigesetzt. Nach 6 Stunden wurde eine Sättigung von  $42,2 \pm 2,0$  % erreicht. Die freigesetzte Menge an Silber stieg nach achttündiger Standzeit nicht weiter an. In Kontrollexperimenten mit undotierten Calciumphosphat-Nanopartikeln, denen entsprechend der silberdotierten Calciumphosphat-Nanopartikel eine äquivalente Menge an Silber zugesetzt wurde, konnte ein Anteil von  $66,26 \pm 0,34$  % des Silbers im Zentrifugat wiedergefunden werden. Bei der Zentrifugation einer Silbernitratlösung wurden  $63,47 \pm 4,07$  % Silber im Zentrifugat wiedergefunden. Die Wiederfindung von Silberionen im Zentrifugat nach der Zentrifugation mit Amicon Ultra Cellulosemembranen wird mit Anteilen von 40 bis 100 % angegeben.<sup>[169,381–384]</sup>



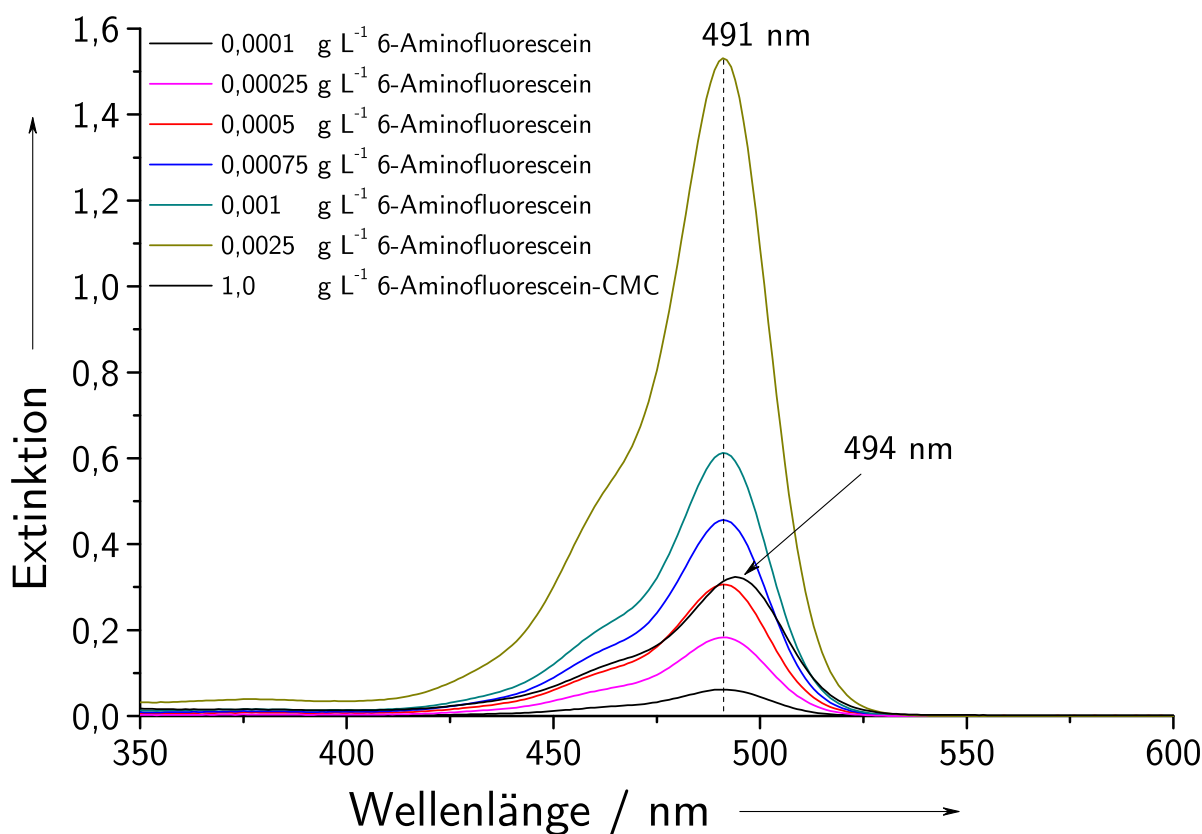
**Tab. 5.4:** Silberfreisetzung aus silberdotierten CMC-stabilisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln in Reinstwasser bei Raumtemperatur ( $N=2$ ).

Zeit / h	1	2	6	8	24
Anteil ( $x \pm \sigma$ ) / %	$31,8 \pm 0,4$	$36,3 \pm 2,5$	$42,2 \pm 2,0$	$45,6 \pm 2,0$	$46,0 \pm 4,0$

Aufgrund der geringen Wiederfindung im Zentrifugat nach der Zentrifugation können die gemessene Silberkonzentrationen nur als minimal freigesetzte Silbermengen aufgefasst werden. Die Einflüsse der Zentrifugeneinheiten und der Carboxymethylcellulose auf die geringe Wiederfindung lassen sich nicht quantifizieren. Die Differenz zwischen der Freisetzung aus silberdotierten und mit Silbernitrat versetzten undotierten Calciumphosphat-Nanopartikeln lässt sich durch eine komplexierende Wirkung der Carboxymethylcellulose nicht erklären. Die schnelle Freisetzung von  $> 30$  % des Silbers innerhalb der ersten Stunde spricht für eine oberflächliche Adsorption der Silberionen an der Nanopartikeloberfläche oder in der Hülle aus Carboxymethylcellulose. Die Löslichkeit von Hydroxylapatit, auch von nanokristallinem Hydroxylapatit, ist bei  $\text{pH}=7$  gering, so dass die Löslichkeit der Nanopartikel in Reinstwasser vernachlässigbar klein ist.<sup>[65,385]</sup> Ein Teil des Silbers ist vermutlich im Kristallgitter der Calciumphosphat-Nanopartikel eingebaut und wird nicht innerhalb von 24 Stunden freigesetzt.

## 5.2 6-Aminofluorescein-Carboxymethylcellulose

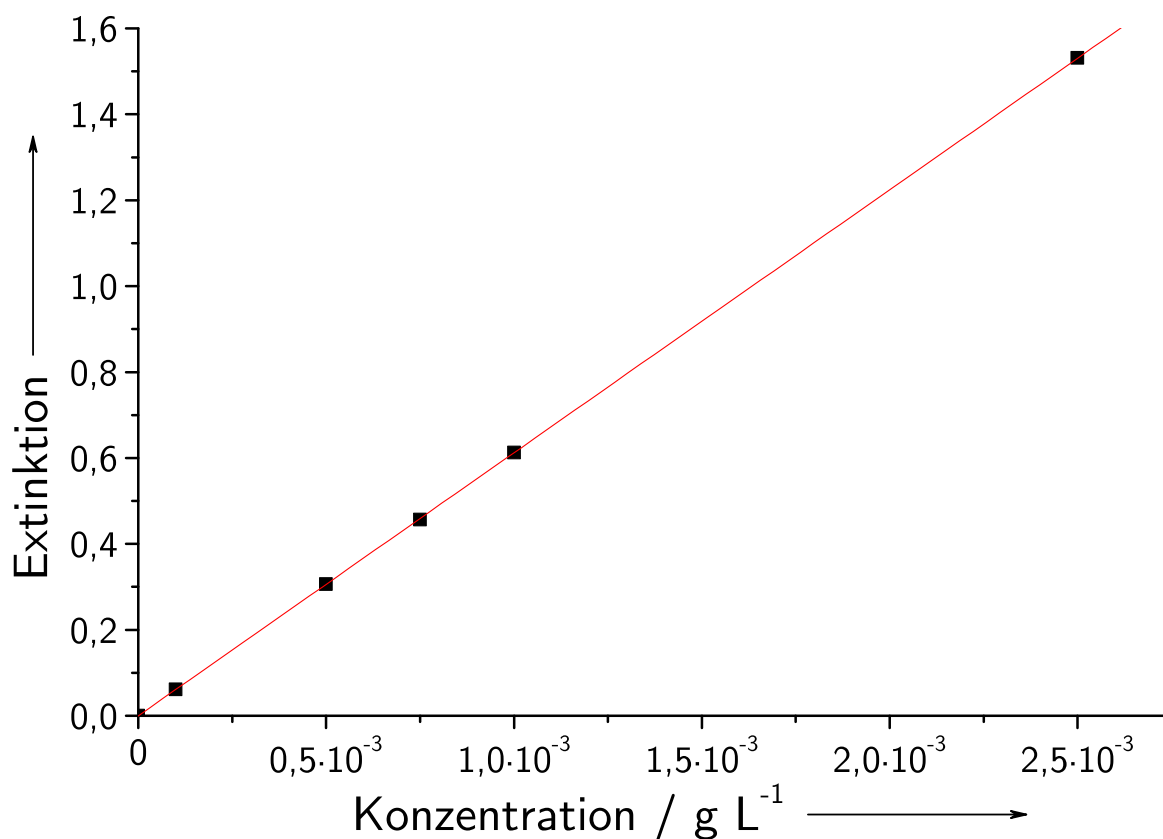
Das nach der Gefriertrocknung erhaltene Produkt der Konjugation von Carboxymethylcellulose mit 6-Aminofluorescein aus Ansatz 1 (F-CMC) war deutlich gelb gefärbt. Das Produkt aus Ansatz 2 war farblos. In Abbildung 5.16 sind UV/Vis-Spektren von 6-Aminofluorescein und 6-Aminofluorescein-Carboxymethylcellulose (Ansatz 1) gelöst in Tris-Glycin-Puffer mit 20 % Ethanol (V/V) bei pH=8,6 dargestellt. Nur in Ansatz 1 konnte eine für Fluorescein typische Extinktionsbande mit einem Maximum bei 494 nm beobachtet werden. Die Extinktionsbande zeigte damit im Vergleich zum freien Fluoreszenzfarbstoff eine leichte Rotverschiebung ( $\Delta\lambda = 3$  nm), welche bei der Konjugation von Fluoreszenzfarbstoffen wie bei Amiden des Aminofluoresceins beobachtet wird.<sup>[386–389]</sup> Das Produkt aus Ansatz 2 zeigte keine Extinktion.



**Abb. 5.16:** Extinktionsspektren (UV/Vis) von 6-Aminofluorescein und 6-Aminofluorescein-Carboxymethylcellulose in Tris-Glycin-Puffer bei pH=8,6 im Bereich von 350 bis 600 nm.

Die in Ansatz 1 konjugierte Carboxymethylcellulose wurde zu 1 g L<sup>-1</sup> in Tris-Glycin-Puffer mit 20 % Ethanol (pH=8,6) gelöst und der Substitutionsgrad abgeschätzt. Die Extinktion

der F-CMC-Lösung betrug 0,3235 bei einer Konzentration von  $1 \text{ g L}^{-1}$  (Abbildung 5.16). Das molare Verhältnis der Monomereinheit (Anhydroglukoseeinheit) der Carboxymethylcellulose zum Farbstoff (Substitutionsgrad,  $\gamma$ ) wurde in Ansatz 1 relativ zu einer Lösung bekannter Konzentration an 6-Aminofluorescein abgeschätzt. Zur Kalibration wurde eine Stammlösung von  $50,0 \text{ mg L}^{-1}$  6-Aminofluorescein in einem Tris-Glycin-Puffer mit 20 % Ethanol ( $V/V$ ) bei  $\text{pH}=8,6$  hergestellt. Durch Verdünnung im ethanolischen Puffer wurde die Stammlösung weiter verdünnt und die maximalen Extinktionen bei einer Wellenlänge von 491 nm gegenüber der Konzentration aufgetragen (Abbildung 5.17). Der Korrelationskoeffizient der linearen Regression betrug  $R^2 = 1$  mit einer Steigung der Regressionsgeraden von 612,18.



**Abb. 5.17:** Konzentrationsabhängige Extinktion von 6-Aminofluorescein in Tris-Glycin-Puffer bei  $\text{pH}=8,6$ . Zur Abschätzung des Substitutionsgrades der F-CMC wurde die Extinktion bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 491 \text{ nm}$  als Funktion der Konzentration aufgetragen. Der Korrelationskoeffizient der linearen Regression beträgt  $R^2 = 1$  mit einer Steigung der Regressionsgeraden von 612,18.

Der Substitutionsgrad wurde mit Gleichung 5.5 berechnet. Die Variable  $a$  beschreibt die Steigung der Regressionsgerade und  $E$  die gemessene Extinktion der F-CMC-Lösung bei

einer Konzentration von  $1 \text{ g L}^{-1}$ . Der Substitutionsgrad wurde unter den Annahmen eines vollständigen Umsatzes (Gleichung 5.6, Molekulargewicht der Anhydroglukoseeinheit  $M_w = 252,11 \text{ g mol}^{-1}$ ) und eines sehr geringen Umsatzes (Gleichung 5.7, Molekulargewicht der Anhydroglukoseeinheit  $M_w = 218,16 \text{ g mol}^{-1}$ ) abgeschätzt.

$$\gamma = \frac{n_{\text{Monomer}}}{n_{\text{Farbstoff}}} = \frac{a \cdot M_{\text{Farbstoff}}}{E \cdot M_{\text{Monomer}}} \quad (5.5)$$

$$\gamma = \frac{612,18 \text{ L g}^{-1} \cdot 347,23 \text{ g mol}^{-1}}{0,3235 \cdot 252,11 \text{ g mol}^{-1}} \approx 2606 \quad (5.6)$$

$$\gamma = \frac{612,18 \text{ L g}^{-1} \cdot 347,23 \text{ g mol}^{-1}}{0,3235 \cdot 218,16 \text{ g mol}^{-1}} \approx 3012 \quad (5.7)$$

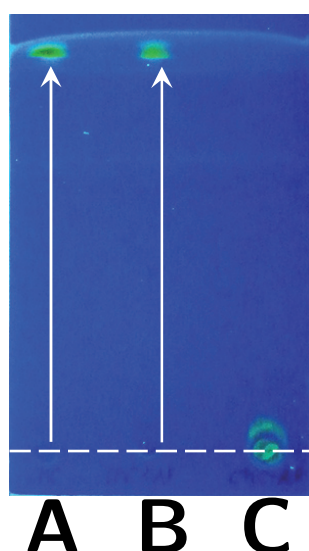
Es zeigt sich für beide Annahmen, dass 0,047 bis 0,055 % der Anhydroglukoseeinheiten mit einem Molekül 6-Aminofluorescein konjugiert sind. Der geringe Substitutionsgrad beeinflusst die mittlere Molmasse der Monomereinheit unwesentlich, so dass der Substitutionsgrad nahe der Annahme in Gleichung 5.7 liegt. Damit kommt auf etwa 3000 Monomereinheiten ein Molekül 6-Aminofluorescein. Der Substitutionsgrad der verwendeten CMC lag bei 0,7. Demnach wurde etwa 1 von 2100 Carboxylfunktionen mit 6-Aminofluorescein umgesetzt. Durch den geringen Substitutionsgrad werden die chemischen Eigenschaften der Carboxymethylcellulose kaum verändert.

Der geringe Substitutionsgrad lässt sich durch die sterische Abschirmung der Carboxylfunktionen in geknäulter Konformation erklären. Bei der Konjugation der Carboxymethylcellulose wurde aufgrund der geringen Wasserlöslichkeit von 6-Aminofluorescein ein Ethanol-Wasser-Gemisch verwendet. Die Löslichkeit von Carboxymethylcellulose nimmt in ethanolischen Lösungen mit steigendem Anteil an Ethanol deutlich ab.<sup>[390]</sup> Die Makromoleküle liegen geknäult vor und aggregieren zu größeren Einheiten. Dabei nimmt auch die freie Beweglichkeit der Makromoleküle ab. Ein Großteil der Carboxylfunktionen ist für die Amidierung nicht mehr zugänglich, so dass die Ausbeute sinkt.

Der direkte Nachweis der kovalenten Kopplung des 6-Aminofluoresceins an die Carboxylfunktion der Carboxymethylcellulose lässt sich aufgrund der unzureichenden Sensitivität der Kernspinresonanz bei geringem Substitutionsgrad nicht führen. Ein indirekter Nachweis wurde mit einer Dünnschichtchromatographie durchgeführt.

In Abbildung 5.18 ist eine Dünnschichtchromatographie-Platte unter Bestrahlung mit UV-Licht ( $\lambda = 396 \text{ nm}$ ) gezeigt. An der Position A wurde ein Tropfen 6-Aminofluorescein-Lösung (Ethanol-Wasser, 1:1 V/V), an der Position B ein Gemisch aus Carboxymethylcellulose und 6-Aminofluorescein (Ethanol-Wasser, 1:1 V/V) und an der Position C ein

Tropfen der gelösten F-CMC (Ethanol-Wasser, 1:1 V/V) aufgetragen. Die Dünnschichtchromatographie wurde mit Ethanol als mobile Phase durchgeführt. Sowohl bei freiem 6-Aminofluorescein (**A**) als auch bei einem Gemisch aus 6-Aminofluorescein und Carboxymethylcellulose (**B**) lief der Fluoreszenzfarbstoff mit der Laufmittelfront. F-CMC (**C**) wurde nicht von der mobilen Phase mitgezogen. Die Wechselwirkung zwischen 6-Aminofluorescein und Carboxymethylcellulose kann in dem Produkt aus Ansatz 1 nicht ionischer Natur sein. Eine ionische Wechselwirkung, wie sie etwa bei einem Gemisch von Carboxymethylcellulose und 6-Aminofluorescein zu erwarten wäre, zeigt in der Dünnschichtchromatographie eine eindeutige Trennung.

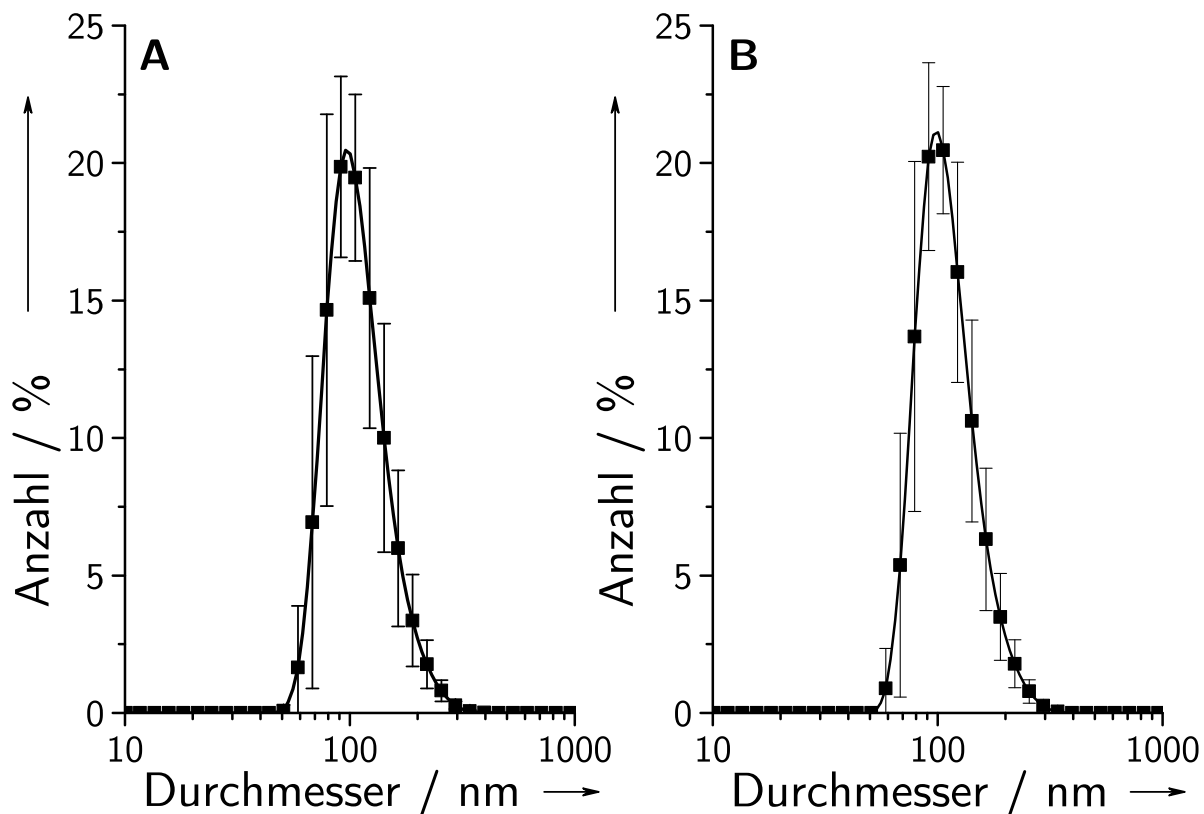


**Abb. 5.18:** Dünnschichtchromatographische Untersuchung der F-CMC. **A:** 6-Aminofluorescein; **B:** ein Gemisch aus 6-Aminofluorescein und CMC; **C:** F-CMC.

### 5.3 6-Aminofluorescein-Carboxymethylcellulose-stabilisierte Calciumphosphat-Nanopartikel

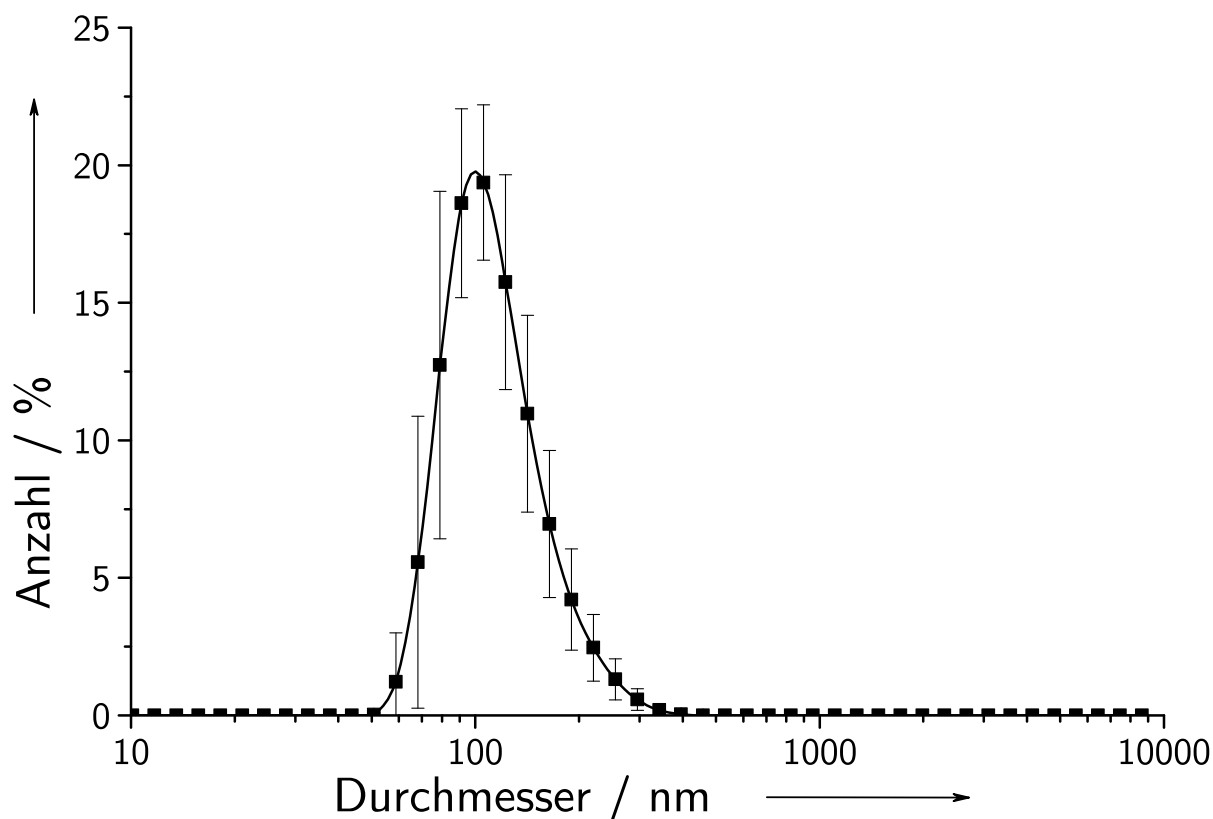
Die mit F-CMC-stabilisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln wurden kolloidchemisch durch die Messung des hydrodynamischen Durchmessers mit der Dynamischen Lichtstreuung untersucht. Die Größenverteilungen der zweifach zentrifugierten und in Reinstwasser redispersierten Calciumphosphat-Nanopartikel, aufgetragen nach der Anzahl, sind in Abbildung 5.19 vor (**A**,  $N=8$ ) und nach (**B**,  $N=8$ ) der Zugabe von Trehalose und Sterilfiltration angegeben. Die mittleren Durchmesser ( $z$ -average) lagen bei  $145 \pm 6$  nm (**A**) bei einem Maximum der Verteilung nach der Anzahl von 96 nm und  $146 \pm 8$  nm (**B**) bei einem Maximum der Verteilung nach der Anzahl von 99 nm. Die Polydispersitätsindizes lagen in

beiden Dispersionen bei Werten  $< 0,100$ . Die Zetapotentiale lagen bei  $-26 \pm 3$  mV **A)** und  $-23 \pm 3$  mV **(B)**.



**Abb. 5.19:** Größenverteilung (DLS) nach der Anzahl von F-CMC-stabilisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln vor **(A)** und nach **(B)** zweifacher Zentrifugation, Redispersion in Reinstwasser und Zugabe von  $50 \text{ mg mL}^{-1}$  Trehalose-Dihydrat.

Nach der Gertirocknung konnten die Dispersionen durch Zugabe von Reinstwasser wieder in ein wässriges Kolloid überführt werden. Die mit der Dynamischen Lichtstreuung gemessene Größenverteilung nach der Anzahl ist in Abbildung 5.20 gezeigt. Der kolloidale Charakter der Dispersion blieb nach der Redispersion in Reinstwasser erhalten. Das Maximum der Verteilungen liegt bei  $d = 100$  nm. Die mittleren hydrodynamischen Durchmesser (*z-average*) lagen bei  $156 \pm 9$  nm ( $N=5$ ). Die Polydispersitätsindizes lagen bei  $0,101 \pm 0,030$  und deuten auf eine monodisperse Verteilung der F-CMC-stabilisierten Calciumphosphat-Nanopartikel hin. Die kolloidchemischen Parameter sind in Tabelle 5.5 zusammengefasst.

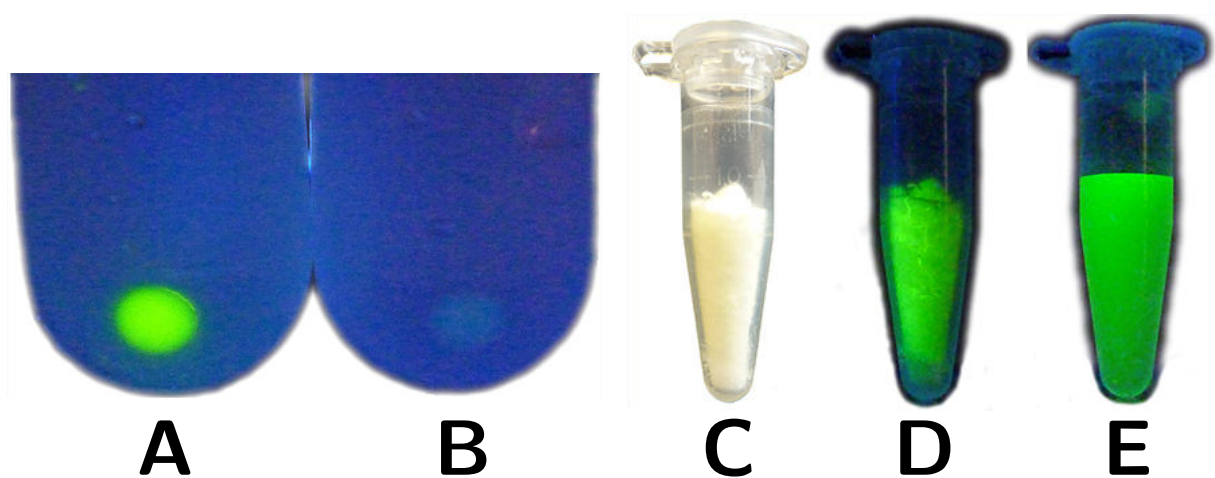


**Abb. 5.20:** Größenverteilung nach der Anzahl (DLS) von gefriergetrockneten F-CMC-stabilisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln nach Redispersion in Reinstwasser.

**Tab. 5.5:** Kolloidchemische Parameter (DLS) von F-CMC-stabilisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln ( $N=8$ ). Die Anzahl unabhängiger Messungen der gefriergetrockneten F-CMC-stabilisierten Calciumphosphat-Nanopartikel betrug  $N=5$ .

	$z$ -average / nm	Maximum / nm	PDI	$\zeta$ / mV
nach der Synthese	$200 \pm 16$	122	$0,157 \pm 0,027$	$-25 \pm 5$
redispergiert	$145 \pm 6$	96	$0,099 \pm 0,033$	$-26 \pm 3$
redispergiert und mit Trehalose steril filtriert	$146 \pm 8$	99	$0,084 \pm 0,026$	$-23 \pm 3$
gefriergetrocknet und redispergiert	$156 \pm 9$	100	$0,101 \pm 0,030$	$-23 \pm 4$

In Abbildung 5.21 (links) ist ein Foto der Zentrifugenröhrchen bei Bestrahlung mit UV-Licht ( $\lambda = 396 \text{ nm}$ ) abgebildet, in denen nach Zentrifugation der Bodensatz von Calciumphosphat-Nanopartikeln zu erkennen ist. Der Bodensatz der mit F-CMC stabilisierten Calciumphosphat-Nanopartikel zeigt im Vergleich zur Kontrolle eine deutlich grüne Fluoreszenz. Die mit dem Produkt aus Ansatz 2 funktionalisierten Calciumphosphat-Nanopartikel zeigen keine Fluoreszenz. In Abbildung 5.21 (rechts) sind Eppendorfgefäße mit in einer Trehalosematrix gefriergetrockneten F-CMC-stabilisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln (C) unter UV-Bestrahlung (D) und nach Redispersion in Reinstwasser und unter UV-Bestrahlung gezeigt (E).



**Abb. 5.21:** F-CMC-stabilisierte Calciumphosphat-Nanopartikel bei Bestrahlung mit UV-Licht. Der Bodensatz F-CMC-stabilsierter Calciumphosphat-Nanopartikel (A) fluoresziert nach der Zentrifugation grün (Ansatz 1). Der Bodensatz der mit CMC aus Ansatz 2 stabilisierten Calciumphosphat-Nanopartikel zeigt keine Fluoreszenz (B). In einer Trehalose-Matrix gefriergetrocknete F-CMC-stabilisierte Calciumphosphat-Nanopartikel (C), unter UV Bestrahlung (D) und in Reinstwasser redispersiert unter UV Bestrahlung (E).

In Abbildung 5.22 ist das UV/Vis-Spektrum von F-CMC-stabilisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln aufgetragen. Als Referenzmessung wurde die Extinktion von CMC-stabilisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln herangezogen. Es lässt sich die charakteristische Extinktionsbande von 6-Aminofluorescein erkennen.

In Abbildung 5.23 ist die emittierte Fluoreszenz von F-CMC-stabilisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln bei Anregung mit monochromatischem Licht der Wellenlänge 488 nm, einer typischen Anregungswellenlänge in der CLSM (Argon-Ionen-Laser), aufgetragen. Die Schulter mit einem Maximum bei 488 nm entspricht der an den Calciumphosphat-Nanopartikeln gestreuten Primärstrahlung mit einer spektralen Bandbreite von 19 nm. Das



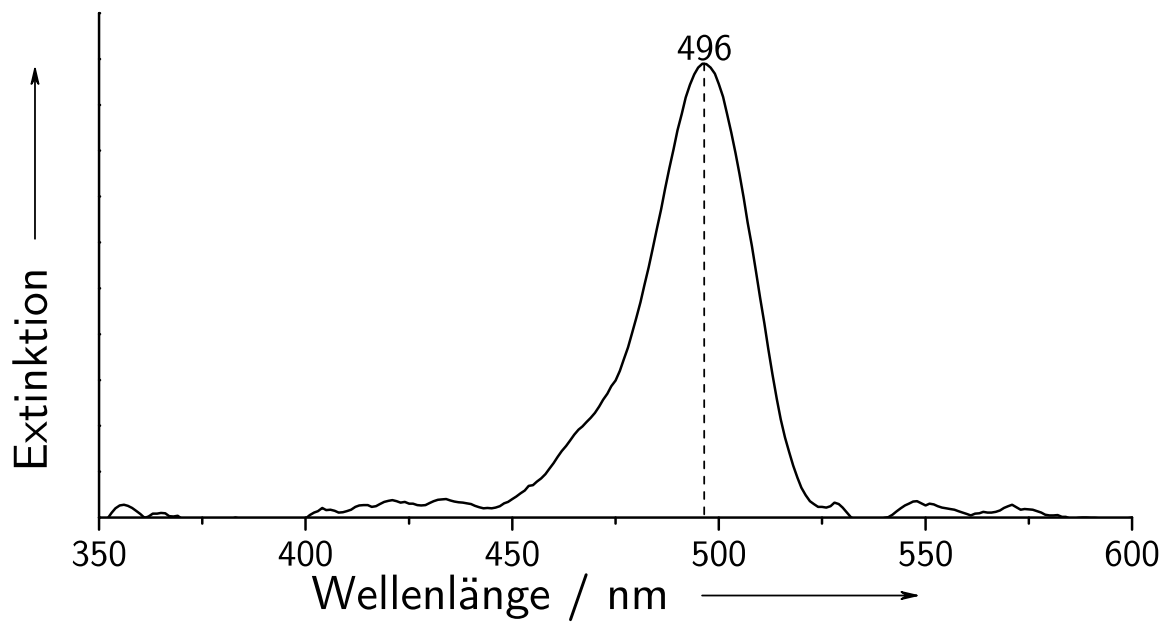


Abb. 5.22: UV/Vis-Spektrum von F-CMC-stabilisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln.

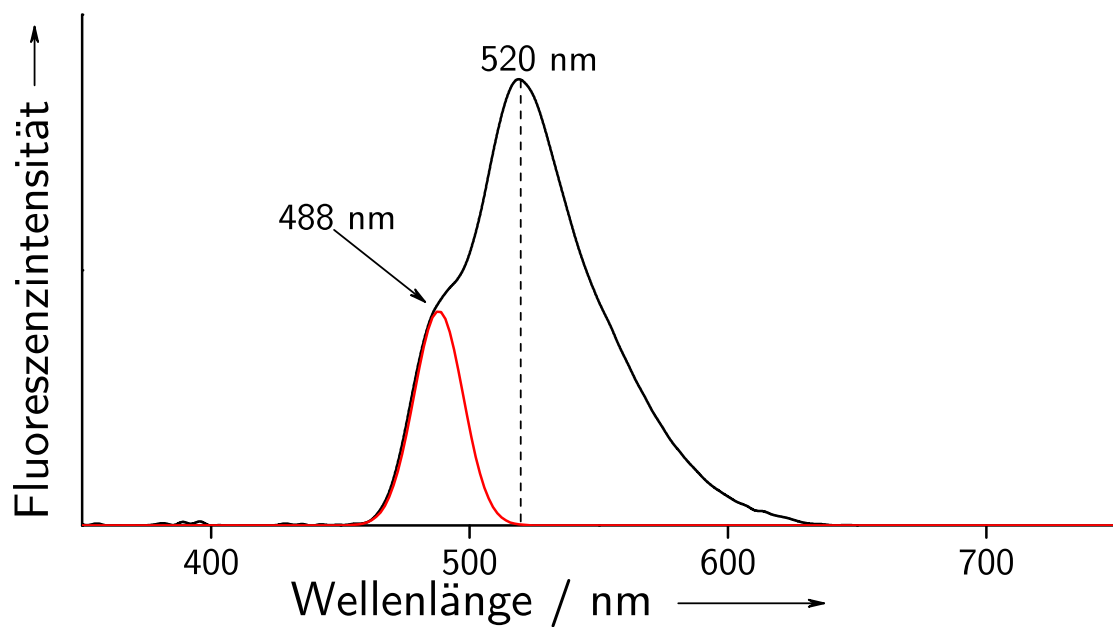


Abb. 5.23: Fluoreszenzspektrum von F-CMC-stabilisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln.

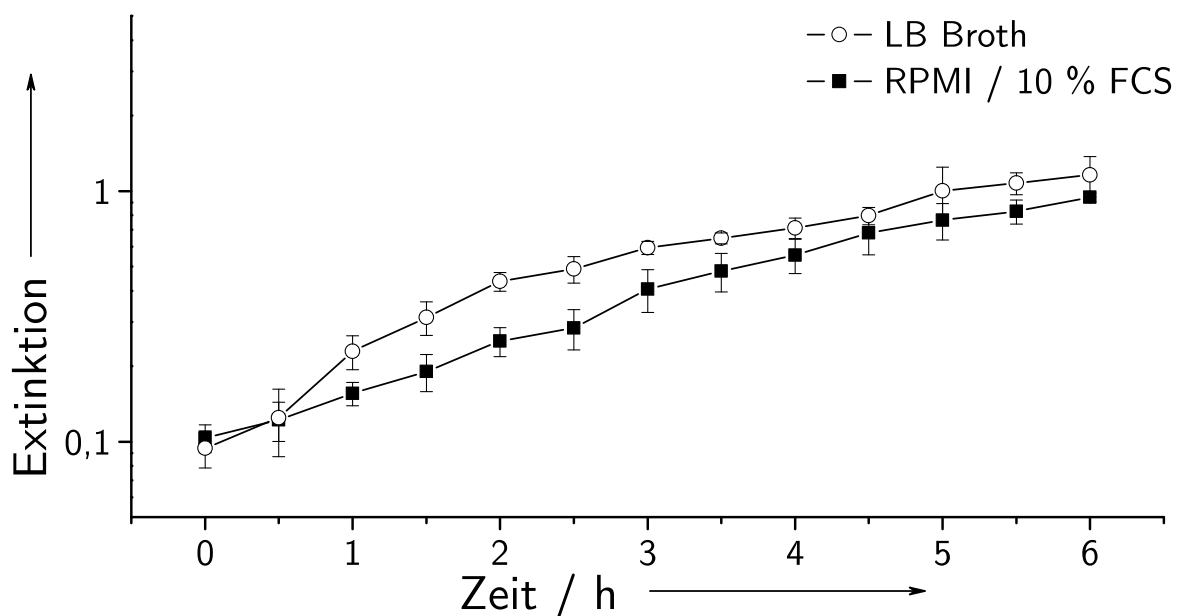
Maximum der emittierten Strahlung liegt bei 520 nm. Die gefriergetrockneten F-CMC-stabilisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln wurden für biologische Untersuchungen der Zellaufnahme von MG-63 Zellen und hMSCs verwendet (Abschnitt 5.6).

## 5.4 Biologische Wirkung silberdotierter Carboxymethylcellulose-stabilisierter Calciumphosphat-Nanopartikel

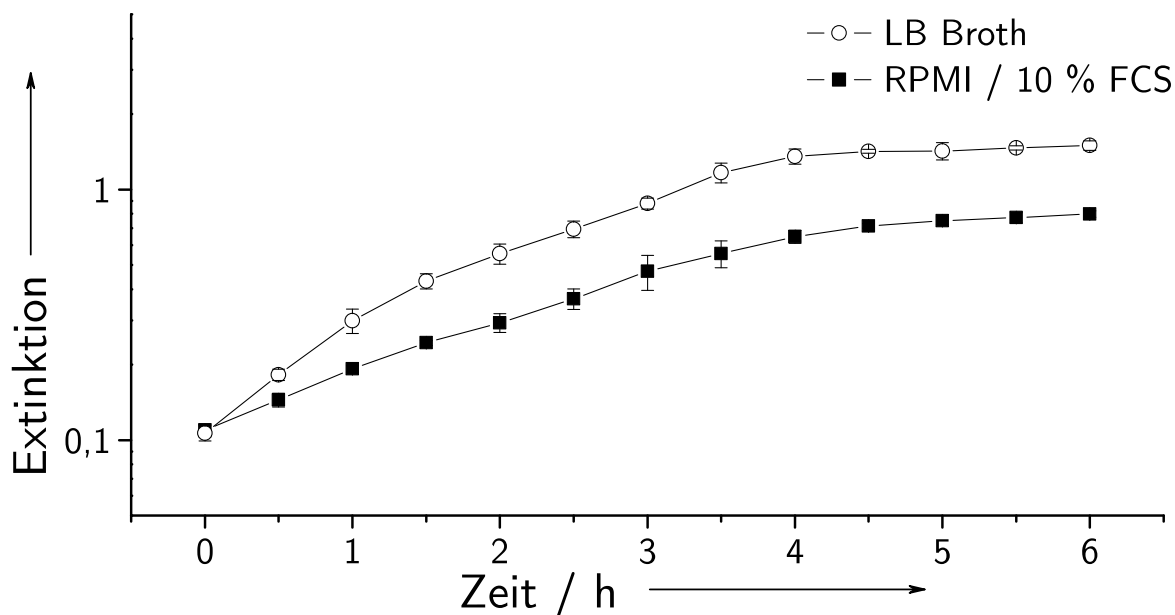
### 5.4.1 Biologische Wirkung gegenüber Bakterien

Die biologische Wirkung von silberdotierten Carboxymethylcellulose-stabilisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln auf das Wachstum von *Escherichia coli* und *Staphylococcus aureus* wurde in zwei unterschiedlichen Nährmedien (LB Broth und RPMI mit 10 % (V/V) FCS) untersucht. Als Kontrollen wurden die Mikroorganismen mit undotierten Calciumphosphat-Nanopartikeln und Silberacetatlösungen entsprechender Silberkonzentration inkubiert. Die Konzentrationen der undotierten Calciumphosphat-Nanopartikel wurden auf die Calciumkonzentrationen der silberdotierten Calciumphosphat-Nanopartikel normiert. Die kolloidchemische Charakterisierung zeigte keine Unterschiede in der Morphologie und Größe der Nanopartikel, so dass von gleichen Partikelkonzentrationen ausgegangen werden kann.

Wachstumskontrollen von *E. coli* und *S. aureus* wurden in reinem LB Broth-Medium und in RPMI-Medium mit 10 % FCS (V/V) durchgeführt. Die Wachstumskurven sind in den Abbildungen 5.24 und 5.25 aufgetragen.



**Abb. 5.24:** Wachstum von *E. coli* in LB Broth und RPMI-Zellnährmedium mit 10 % FCS. Übernachtskulturen wurden auf eine optische Dichte von 0,1 verdünnt und bei 37 °C inkubiert.



**Abb. 5.25:** Wachstum von *S. aureus* in LB Broth und RPMI-Zellnährmedium mit 10 % FCS. Übernachtskulturen wurden auf eine optische Dichte von 0,1 verdünnt und bei 37 °C inkubiert.

Das Wachstum von *E. coli* und *S. aureus* wurde anhand der Messung der optischen Trübung der Bakteriendispersionen durch Extinktionsmessung bei einer Wellenlänge von 600 nm beobachtet. Das Wachstum von *E. coli* und *S. aureus* in RPMI-Zellnährmedium mit Zusatz von 10 % (V/V) fetalem Kälberserum ist jeweils leicht vermindert im Vergleich zum Wachstum in LB Broth. Einen stark hemmenden oder bakteriziden Einfluss zeigte RPMI mit 10 % FCS (V/V) nicht. RPMI-Zellnährmedium ist ein typisches Nährmedium für die Kultivierung von eukaryotischen Zelllinien und nicht auf den Stoffwechsel von Bakterien optimiert. Die Zusammensetzung von RPMI ohne den Zusatz des komplexen Mediums FCS ist in Tabelle 3.1 in Abschnitt 3.16 aufgeführt.

LB Broth ist ein komplexes Medium, welches standardmäßig für die Kultivierung von *E. coli* und anderen Bakterienstämmen eingesetzt wird, und womit hohe Wachstumsraten erzielt werden können.<sup>[391–397]</sup> Es enthält neben  $5 \text{ g L}^{-1}$  NaCl ( $8,56 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ ),  $10 \text{ g L}^{-1}$  Trypton und  $5 \text{ g L}^{-1}$  Hefeextrakt.<sup>[398]</sup> Die chemischen Zusammensetzungen von Trypton und Hefeextrakt lassen sich ähnlich wie die von fetalem Kälberserum nicht genau angeben und variieren je nach Ursprung. Die Ursachen für das verminderte Wachstum in RPMI mit 10 % (V/V) lassen sich anhand der Wachstumskurven und der komplexen Zusammensetzungen der Medien nicht ableiten.<sup>[399,400]</sup>

Die Wachstumskurven zeigen jedoch, dass sich RPMI mit 10 % FCS eignet, *E. coli* und *S. aureus* für vergleichende Studien zur toxischen Wirkung von Silber unter Beibehaltung gleicher Kulturbedingungen zu kultivieren. Der Einfluss des Mediums auf die toxische Wirkung von Silber durch Komplexierung von Silberionen durch Ionen und organische Liganden wird so in erster Näherung konstant gehalten. Eine theoretische Betrachtung der Silberspezies in RPMI-Medium wird in Abschnitt 5.5 beschrieben.

**Tab. 5.6:** Biologische Wirkung von Silberacetat und Silberacetat mit Zusatz von  $2 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$  Trehalose auf *E. coli* und *S. aureus* in LB Broth-Medium. Alle Konzentrationsangaben sind als Silberkonzentrationen angegeben.

		Silberacetat / LB ( $N=4$ )		Silberacetat + Trehalose / LB ( $N=3$ )	
Zelldichte / $\text{mL}^{-1}$		MHK / $\mu\text{g mL}^{-1}$	MBK / $\mu\text{g mL}^{-1}$	MHK / $\mu\text{g mL}^{-1}$	MBK / $\mu\text{g mL}^{-1}$
$10^3$	<i>E. coli</i>	3,5	3,5-5	2,5	
	<i>S. aureus</i>	2,5	5		
$10^4$	<i>E. coli</i>	3,5	7,5	2,5	2,5-3,5
	<i>S. aureus</i>	3,5	7,5		
$10^5$	<i>E. coli</i>	3,5-5	7,5	2,5	2,5-3,5
	<i>S. aureus</i>	3,5	7,5		
$10^6$	<i>E. coli</i>	5	7,5	2,5	3,5-5
	<i>S. aureus</i>	5	7,5		

In den Tabellen 5.6 bis 5.8 sind die minimalen hemmenden (MHK) und bakteriziden (MBK) Konzentrationen für die Inkubation mit Silberacetatlösungen, Silberacetatlösungen mit Zusatz von Trehalose und silberdotierten Calciumphosphat-Nanopartikeln in Abhängigkeit von der Zelldichte im Inokulum zusammengefasst. Bei allen eingesetzten Konzentrationen konnte kein hemmender oder bakterizider Effekt der undotierten Calciumphosphat-Nanopartikel beobachtet werden. Die Stabilitätsuntersuchungen zeigten, dass die mittleren hydroxynamischen Durchmesser (*z-average*) sich während der Inkubationsdauer nicht signifikant änderten. Ein Auflösen der Nanopartikel wurde nicht beobachtet, da die Löslichkeit von calciumdefizitärem Hydroxylapatit bei  $\text{pH} > 7$  ohnehin sehr gering ist. *E. coli* und *S. aureus* zeigen darüber hinaus eine hohe Toleranz gegenüber extrazellulären Calcium- und Phosphatkonzentrationen, wobei die intrazellulären Ionenkonzentrationen über aktiven Efflux konstant gehalten werden. [401–409]

**Tab. 5.7:** Biologische Wirkung von Silberacetat und Silberacetat mit Zusatz von Trehalose auf *E. coli* und *S. aureus* in RPMI mit 10 % FCS (V/V). Alle Konzentrationsangaben sind als Silberkonzentrationen angegeben.

Zelldichte / mL <sup>-1</sup>		Silberacetat / RPMI 10 % FCS (N=9)		Silberacetat + Trehalose / RPMI 10 % FCS (N=3)	
		MHK / µg mL <sup>-1</sup>	MBK / µg mL <sup>-1</sup>	MHK / µg mL <sup>-1</sup>	MBK / µg mL <sup>-1</sup>
10 <sup>3</sup>	<i>E. coli</i>	0,5-1	0,5-1,25	0,5-0,62	1
	<i>S. aureus</i>	0,5	1,25	<1	1
10 <sup>4</sup>	<i>E. coli</i>	0,75	1-1,25	0,62-1	1-1,25
	<i>S. aureus</i>	0,75	2,5	<1	1,25
10 <sup>5</sup>	<i>E. coli</i>	1-1,25	2,5	1	1-1,25
	<i>S. aureus</i>	1,25	2,5	1	2,5
10 <sup>6</sup>	<i>E. coli</i>	1,25-2,5	2,5-5	1	1-1,25
	<i>S. aureus</i>	2,5	5	1,25	2,5

Silberacetatlösung und silberdotierte Calciumphosphat-Nanopartikel zeigten eine hemmende Wirkung auf das Wachstum von *E. coli* in LB Broth-Medium für Silberkonzentrationen oberhalb 3,5 µg mL<sup>-1</sup>. Eine bakterizide Konzentration wurde für Silberkonzentrationen oberhalb 3,5 bis 5 µg mL<sup>-1</sup> erreicht. Bei *S. aureus* lagen die minimalen hemmenden Silberkonzentrationen bei 2,5 bis 5 µg mL<sup>-1</sup>, die minimalen bakteriziden Silberkonzentrationen bei 5 bis 7,5 µg mL<sup>-1</sup>. Die Zelldichten im Inokulum wirkten sich bei beiden Bakterienstämmen kaum auf die inhibierenden und bakteriziden Konzentrationen aus.

Der Einfluss von Trehalose auf die toxische Wirkung von Silberacetat wurden in LB Broth-Medium nur gegenüber *E. coli* untersucht. Trehalose verstärkte die toxische Wirkung von Silberacetat geringfügig, wobei bei der Inkubation mit Trehalose ohne Silber keine hemmende oder bakterizide Wirkung beobachtet werden konnte. In RPMI mit 10 % FCS (V/V) wurde die toxische Wirkung von Silberacetat gegenüber *E. coli* und *S. aureus* durch den Zusatz von Trehalose geringfügig verstärkt. Eine genaue Quantifizierung des verstärkenden Effekts ist aufgrund der intervall-zensierten Daten nicht möglich. Der maximale verstärkende Effekt von Trehalose zeigte sich in einer Halbierung der minimalen hemmenden und bakteriziden Konzentrationen (Tabelle 5.7).

Silberdotierte Calciumphosphat-Nanopartikel zeigten eine hemmende Wirkung auf das Wachstum von *E. coli* in LB Broth und RPMI mit 10 % FCS (V/V) für Silberkonzentrationen oberhalb 0,5 µg mL<sup>-1</sup>. Gegenüber *S. aureus* zeigten Silberkonzentrationen oberhalb

0,5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  in LB Broth-Medium und 0,62  $\mu\text{g mL}^{-1}$  in RPMI mit 10 % FCS (V/V) eine hemmende Wirkung auf das Wachstum. Bakterizide Silberkonzentrationen wurden in LB Broth-Medium bei 0,62 bis 2,5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  Silber gegenüber *E. coli* und 1 bis 2,5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  gegenüber *S. aureus* erreicht. In RPMI mit 10 % FCS (V/V) zeigten Silberkonzentrationen von 1,25 bis > 3  $\mu\text{g mL}^{-1}$  eine bakterizide Wirkung gegenüber *E. coli* und von 1,25 bis 2,5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  eine bakterizide Wirkung gegenüber *S. aureus*.

**Tab. 5.8:** Biologische Wirkung von CMC-stabilisierten silberdotierten Calciumphosphat-Nanopartikeln auf *E. coli* und *S. aureus* in LB Broth und RPMI mit 10 % FCS (V/V). Alle Konzentrationsangaben sind als Silberkonzentrationen angegeben.

		Silberdotierte Calciumphosphat-Nanopartikeln / LB (N=9)		Silberdotierte Calciumphosphat-Nanopartikeln / RPMI 10 % FCS (N=3)	
Zelldichte / $\text{mL}^{-1}$		MHK / $\mu\text{g mL}^{-1}$	MBK / $\mu\text{g mL}^{-1}$	MHK / $\mu\text{g mL}^{-1}$	MBK / $\mu\text{g mL}^{-1}$
$10^3$	<i>E. coli</i>	0,5	0,62-1	0,5-0,62	1,25
	<i>S. aureus</i>	0,5-0,62	1-1,25	0,62-1	1,25-2,5
$10^4$	<i>E. coli</i>	0,62	1-1,25	1	2,5-3
	<i>S. aureus</i>	0,62-1	1-1,25	1	1,25-2,5
$10^5$	<i>E. coli</i>	0,62-1	1,25-2,5	1-1,25	2,5-3
	<i>S. aureus</i>	1	1,25-2,5	1,25-2,5	1,25-2,5
$10^6$	<i>E. coli</i>	1	1,25-2,5	1-1,25	>3
	<i>S. aureus</i>	1-1,25	1,25-2,5	1,25-2,5	1,25-2,5

Aus den in den Tabellen 5.6 bis 5.8 ermittelten Daten ist ersichtlich, dass die minimalen hemmenden und bakteriziden Konzentrationen von Silberacetat und silberdotierten Calciumphosphat-Nanopartikeln gegenüber *E. coli* und *S. aureus* in RPMI mit 10 % FCS (V/V) im Bereich von 0,5 bis 5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  liegen. Die intervallzensierten Daten lassen keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Bakterienstämmen erkennen. In LB Broth-Medium zeigten *E. coli* und *S. aureus* eine geringfügig höhere Toleranz gegenüber Silberacetat (2,5 bis 7,5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). Diese Daten steht im Einklang mit Arbeiten von Ramsstedt *et al.*, die bei der Inkubation von *S. aureus* mit Silbernitrat eine größere Toleranz in LB Broth als in RPMI beobachteten.<sup>[410]</sup> Die effektiven Silberkonzentrationen der silberdotierten Calciumphosphat-Nanopartikel lagen in LB Broth hingegen im Bereich von 0,5 bis 2,5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .<sup>[411]</sup>

Die ermittelten Daten stehen im Einklang mit den in der Literatur veröffentlichten Daten zu hemmenden und bakteriziden Konzentrationen von  $\text{Ag}^+$  gegenüber *E. coli* und *S. aureus* ( $0,5$  bis  $7 \mu\text{g mL}^{-1}$ ).<sup>[173,412–416]</sup>

### 5.4.2 Biologische Wirkung gegenüber hMSCs und PBMCs

Die biologische Wirkung von silberdotierten Carboxymethylcellulose-stabilisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln wurde an humanen mesenchymalen Stammzellen und an peripheren mononukleären Zellen des Blutes, bestehend aus Monozyten und Lymphozyten, untersucht. Die eingesetzten Mengen an Silberacetat und silberdotierten Calciumphosphat-Nanopartikeln wurde in allen Versuchen auf die Silberkonzentration normiert. Die untersuchten Mengen an undotierten Calciumphosphat-Nanopartikeln wurden entsprechend der Calciumkonzentrationen der Experimente mit silberdotierten Calciumphosphat-Nanopartikeln gewählt. Hierdurch konnte sichergestellt werden, dass in den Experimenten mit undotierten und mit silberdotierten Calciumphosphat-Nanopartikeln gleiche Partikelkonzentrationen eingesetzt wurden. HMSCs und PBMCs wurden, wie in den Abschnitten 4.5.1.1 und 4.5.1.2 beschrieben, in RPMI-Medium mit Zusatz von 10 % fetalem Kälberserum bei  $37^\circ\text{C}$  und 5 %  $\text{CO}_2$  kultiviert. Die Zellvitalitäten wurden nach 24-stündiger Inkubation ermittelt.

Die Zellvitalität von hMSCs wurde mit Calcein-AM untersucht.<sup>[417]</sup> Als Indikator der Zellvitalität wird die Enzymaktivität von Esterasen, die die Verseifung des Acetoxymethylesters katalysieren, gemessen. Nach der Hydrolyse von Calcein-AM kann die freie Tetracarbonsäure Calciumionen komplexieren. Der Calcium-Calcein-Komplex zeigt dabei eine starke grüne Fluoreszenz. Die eingesetzten Calcein-AM-Konzentrationen wurden so eingesetzt, dass keine erhöhte Fluoreszenz durch den Zusatz von Calciumphosphat-Nanopartikeln im Vergleich zu den Kontrollen gemessen werden konnte.

Undotierte CMC-stabilisierte Calciumphosphat-Nanopartikel zeigten gegenüber hMSCs keine toxische Wirkung. Auch bei der höchsten Calciumkonzentration von  $264 \mu\text{g mL}^{-1}$  ( $6,6 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ) wurde keine Abnahme der Zellvitalität beobachtet (Abbildung 5.26). Die toxische Wirkung von Silberionen wurde mit Silberacetatlösungen untersucht (Abbildung 5.27). Ab einer Konzentration von  $2,25 \mu\text{g mL}^{-1}$  Silber wurde eine leichte Abnahme der Zellviabilität beobachtet. Bei  $2,5 \mu\text{g mL}^{-1}$  betrug die Zellviabilität  $< 20 \%$ . Bei  $3,0 \mu\text{g mL}^{-1}$  wurde die letale Konzentration nahezu erreicht. Der Einfluss von Trehalose auf die toxische Wirkung von Silberionen in Form von Silberacetat auf hMSCs wurde durch die Zugabe von  $0,02 \text{ mol L}^{-1}$  Trehalose zum Zellkulturmedium ermittelt. Es ließ sich ein verstärkender Effekt auf die toxische Wirkung beobachten (Abbildung 5.27).



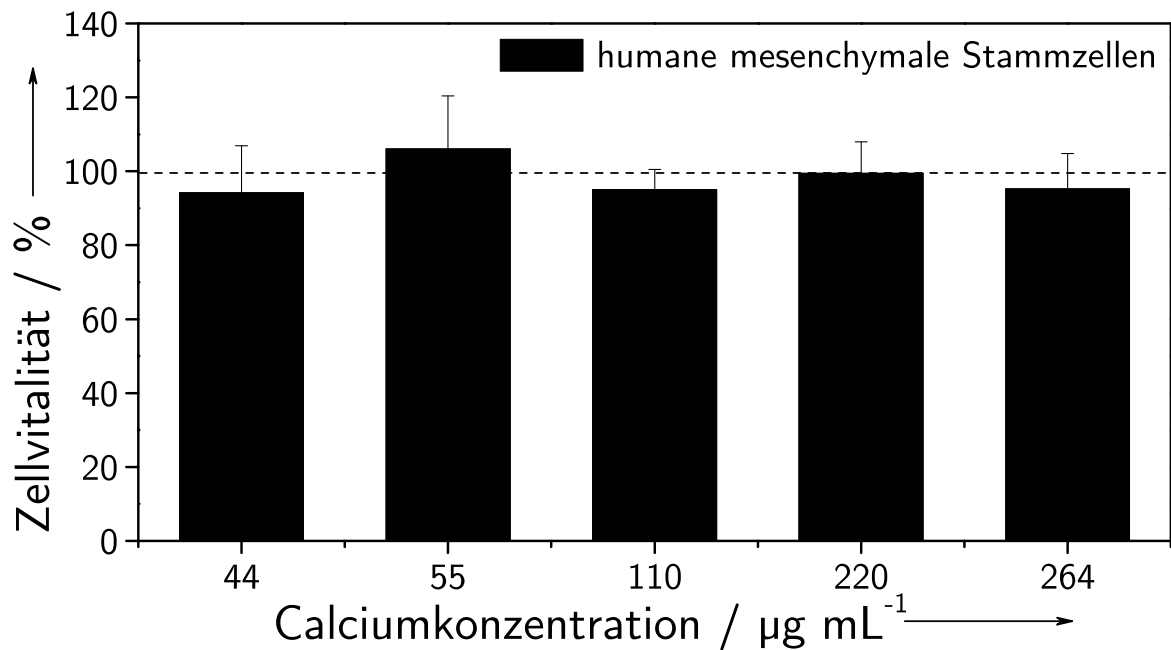


Abb. 5.26: Zellvitalität von hMSCs nach der Inkubation mit undotierten Calciumphosphat-Nanopartikeln. Die eingesetzten Mengen an Nanopartikeln sind auf den Calciumanteil normiert und entsprechen den Calciumkonzentrationen bei der Inkubation mit silberdotierten Calciumphosphat-Nanopartikeln ( $N=3$ ).

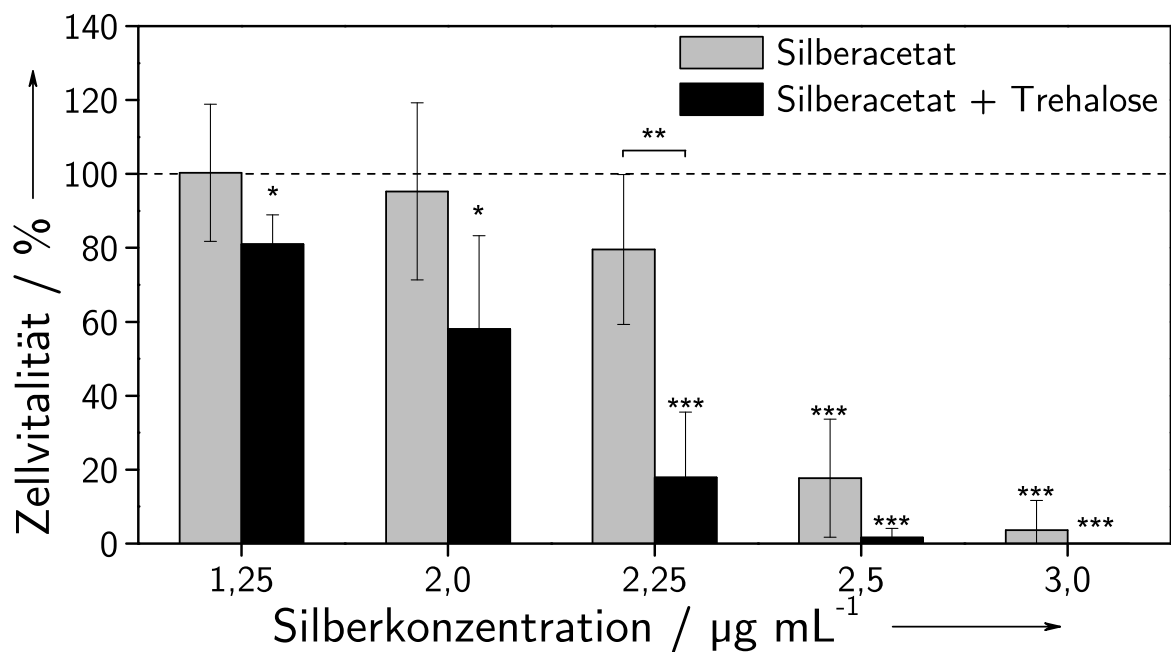
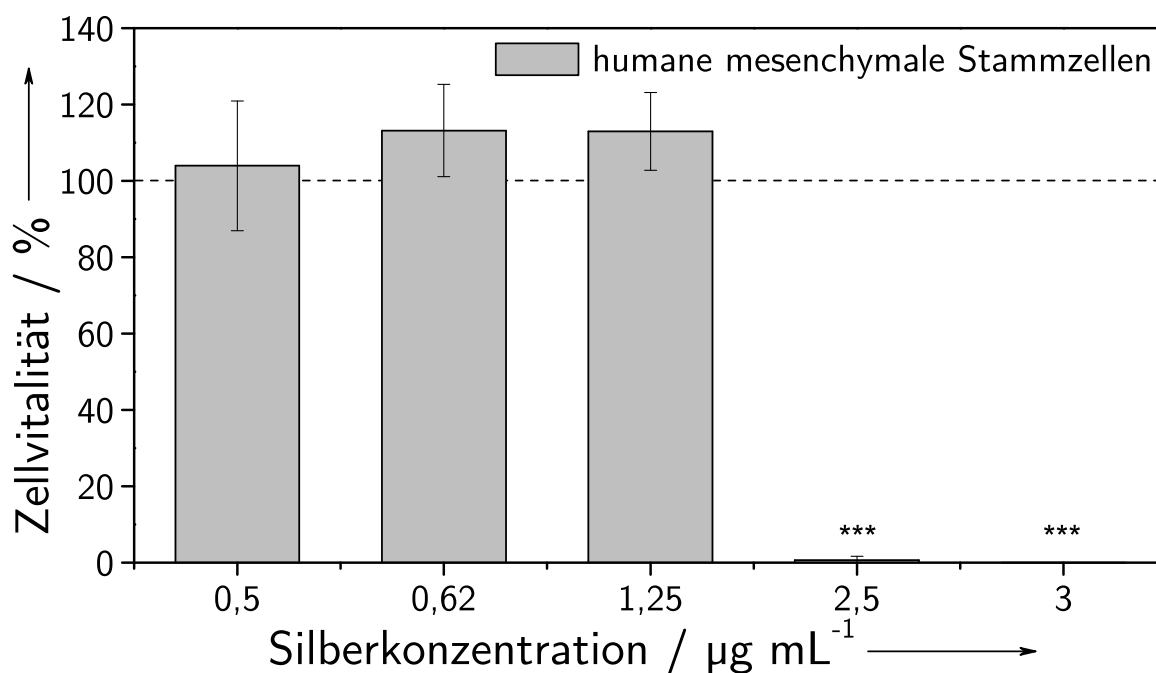


Abb. 5.27: Zellvitalität von hMSCs nach der Inkubation mit Silberacetatlösung ( $N=3$ , \*  $p<0,05$ ; \*\*  $p<0,01$ ; \*\*\*  $p<0,001$ ).



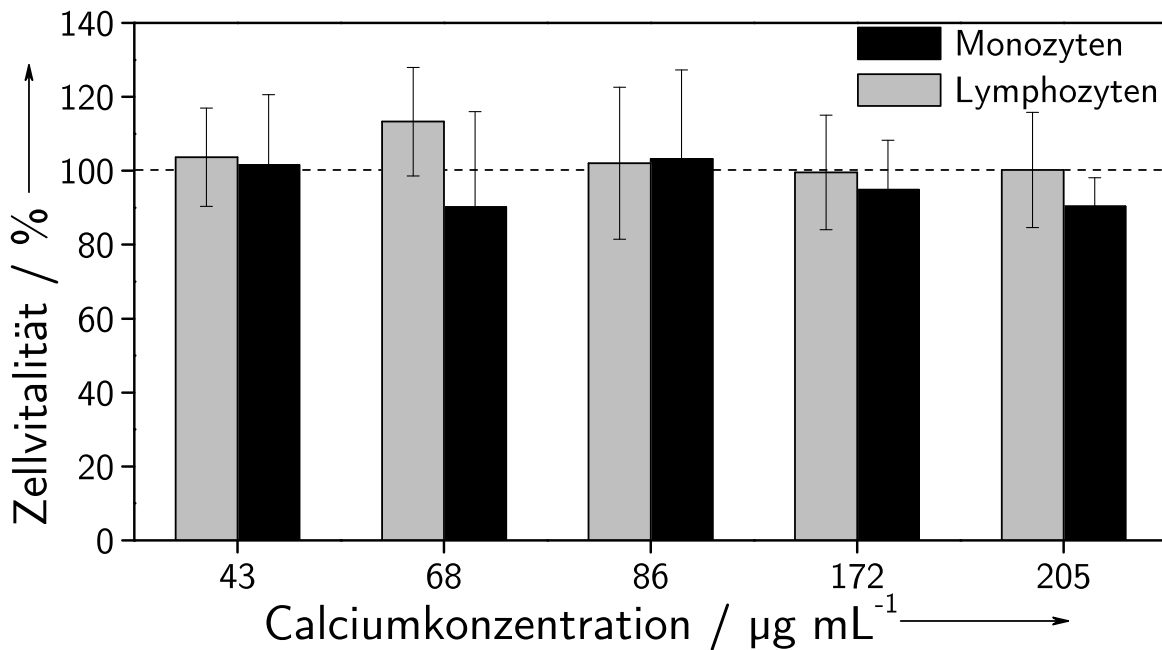
**Abb. 5.28:** Zellvitalität von hMSCs nach der Inkubation mit silberdotierten Calciumphosphat-Nanopartikeln ( $N=3$ , \*\*\*  $p<0,001$ ).

Bei einer Silberkonzentration von  $2,25 \mu\text{g mL}^{-1}$  betrug die Zellviabilität  $< 20 \%$  vergleichbar einer Inkubation mit  $2,5 \mu\text{g mL}^{-1}$  ohne Zugabe von Trehalose. Wachstumskontrollen mit Zugabe entsprechender Mengen an Trehalose zum Zellkulturmedium zeigten keinen Einfluss auf die Zellvitalität.

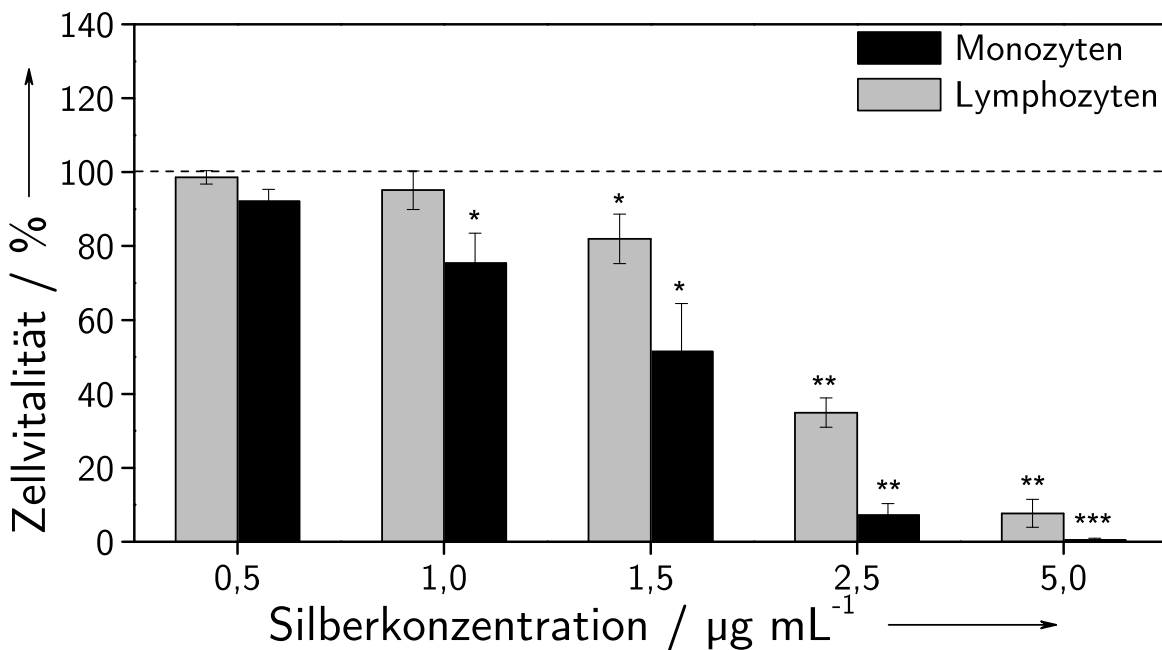
Die silberdotierten CMC-stabilisierten Calciumphosphat-Nanopartikel zeigten gegenüber humanen mesenchymalen Stammzellen eine toxische Wirkung ab einer Silberkonzentration von  $2,5 \mu\text{g mL}^{-1}$  (Abbildung 5.28). Mit  $2,5 \mu\text{g mL}^{-1}$  Silber war zugleich die letale Konzentration erreicht.

Die Zellvitalität von PBMCs wurde durch die Anfärbung toter Zellen mit 7-AAD und die Zählung mittels FACS untersucht. Undotierte CMC-stabilisierte Calciumphosphat-Nanopartikel zeigten gegenüber PBMCs keine toxische Wirkung. Auch bei der höchsten Calciumkonzentration wurde keine signifikante Abnahme der Zellvitalität beobachtet (Abbildung 5.29).

Die toxische Wirkung von Silberionen wurde mit Silberacetatlösungen untersucht (Abbildung 5.30). Ab einer Konzentration von  $1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$  Silber wurde eine signifikante Abnahme der Zellviabilität von Monozyten beobachtet. Ab einer Konzentration von  $1,5 \mu\text{g mL}^{-1}$  Silber wurde eine signifikante Abnahme der Zellviabilität von Lymphozyten beobachtet. Oberhalb  $5,0 \mu\text{g mL}^{-1}$  wurde die letale Silberkonzentration für Monozyten erreicht.



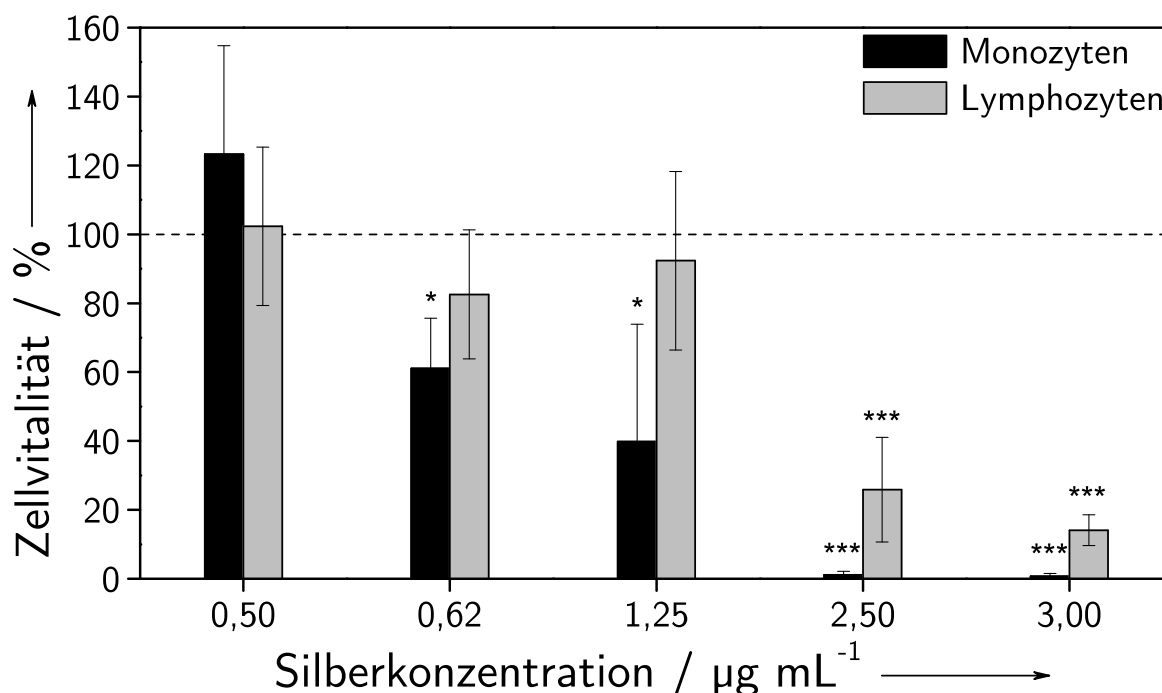
**Abb. 5.29:** Zellvitalität von PBMCs nach der Inkubation mit undotierten Calciumphosphat-Nanopartikeln. Die eingesetzten Mengen an Nanopartikeln sind auf den Calciumanteil normiert und entsprechen den Calciumkonzentrationen bei der Inkubation mit silberdotierten Calciumphosphat-Nanopartikeln ( $N=3$ ).



**Abb. 5.30:** Zellvitalität von PBMCs nach 24-stündiger Inkubation mit Silberacetatlösung ( $N=3$ , \*  $p<0,05$ ; \*\*  $p<0,01$ ; \*\*\*  $p<0,001$ ).

Bei  $5,0 \mu\text{g mL}^{-1}$  Silber betrug die Vitalität von Lymphozyten 8 %. Lymphozyten zeigten damit eine größere Toleranz gegenüber Silber in Form von Silberacetat.

Die silberdotierten CMC-stabilisierten Calciumphosphat-Nanopartikel bewirkten bei Monozyten oberhalb einer Silberkonzentration von  $0,62 \mu\text{g mL}^{-1}$  eine signifikante Abnahme der Vitalität. Eine letale Silberkonzentration wurde bei  $2,5 \mu\text{g mL}^{-1}$  erreicht. Bei Lymphozyten wurde eine signifikante Abnahme der Vitalität bei  $2,5 \mu\text{g mL}^{-1}$  Silber beobachtet. Lymphozyten zeigten ebenfalls eine größere Toleranz gegenüber Silber in Form von silberdotierten CMC-stabilisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln (Abbildung 5.31).



**Abb. 5.31:** Zellvitalität von PBMCs nach der Inkubation mit silberdotierten Calciumphosphat-Nanopartikeln ( $N=3$ , \*  $p<0,05$ ; \*\*\*  $p<0,001$ ).

In Tabelle 5.9 sind die toxischen Konzentrationen von silberdotierten CMC-stabilisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln und Silberacetat auf humane mesenchymale Stammzellen und periphere mononukleäre Zellen des Blutes nach 24-stündiger Inkubation in RPMI / 10 % FCS Zellnährmedium zusammengefasst. Es wird deutlich, dass für alle untersuchten Zelltypen die Konzentrationen, oberhalb derer eine signifikante Abnahme der Zellvitalität zu beobachten ist, im Bereich von  $0,62$  bis  $2,5 \mu\text{g mL}^{-1}$  liegen.

Die in der Literatur genannten toxischen Konzentrationen von Silber in Form gelöster Silbersalze (Silbernitrat und Silberacetat) liegen in einem ähnlichen Bereich von  $0,5$  bis  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ . [171,174,410,418–420] Albers *et al.* beobachteten eine zytotoxische Wirkung von Silbernitrat gegenüber primären Osteoblasten und Osteoklasten der Maus bei einer Silber-

konzentration von  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ .<sup>[174]</sup> Toxische Konzentrationen von Silbernitrat gegenüber PBMCs wurden mit 1 bis  $2,5 \mu\text{g mL}^{-1}$  angegeben.<sup>[421]</sup>

**Tab. 5.9:** Toxische Konzentrationen von silberdotierten Calciumphosphat-Nanopartikeln und Silberacetat auf hMSCs und PBMCs nach 24-stündiger Inkubation in RPMI / 10 % FCS. Die Konzentrationsangaben sind auf den Silbergehalt normiert.

	Vertrauensbereich	hMSCs	Monozyten	Lymphozyten
Silberdotierte Calciumphosphat-Nanopartikel / $\mu\text{g mL}^{-1}$ ( $N=3$ )	$p < 0,05$	–	0,62	–
	$p < 0,01$	–	–	–
	$p < 0,001$	2,5	2,5	2,5
Silberacetat / $\mu\text{g mL}^{-1}$ ( $N=3$ )	$p < 0,05$	–	1,0	1,5
	$p < 0,01$	–	2,5	2,5
	$p < 0,001$	2,5	5	> 5

#### 5.4.3 Vergleich der toxischen Konzentrationen von silberdotierten Calciumphosphat-Nanopartikeln und Silberacetat gegenüber Bakterien, hMSCs und PBMCs

Zahlreiche Untersuchungen zur antimikrobiellen und insbesondere zur antibakteriellen Wirkung von Silber sind in den vergangenen Jahren publiziert worden.<sup>[153,165–183]</sup> Das experimentelle Design und die ermittelten wirksamen Konzentrationen variieren mitunter stark und lassen sich nur unzureichend vergleichen. Dies liegt zum Einen an den toxikologischen Messgrößen, welche den toxischen Effekt quantifizieren (Abschnitt 2.2), zum Anderen an den gänzlich unterschiedlichen Wachstumsverhalten von Prokaryoten und Eukaryoten sowie nicht vergleichbaren experimentellen Durchführungen.

So werden in der Mikrobiologie zur Beurteilung der Wirksamkeit von antibiotisch wirkenden Substanzen häufig die minimale Hemm-Konzentration (MHK) und die minimale bakterizide Konzentration (MBK) bestimmt. Während die minimale Hemm-Konzentration eine Messgröße für den hemmenden Einfluss einer Substanz auf das Wachstum planktonischer Bakterien darstellt, wird mit der minimalen bakteriziden Konzentration die Konzentration bestimmt, bei der 99,9 % der Bakterien abgetötet werden.<sup>[332,422–424]</sup> Bei der MHK wird die Zelldichte photometrisch bestimmt und die Konzentration, bei der eine Abnahme der Zelldichte im Vergleich zur Kontrolle beobachtet wird, als minimale Hemm-Konzentration bezeichnet. Sie stellt damit ausschließlich ein Maß der Wachstumshemmung

dar.<sup>[332,424]</sup> Inwieweit Bakterien abgetötet oder insgesamt nur in ihrer Proliferation gehemmt werden, lässt sich nicht ableiten. Die MBK wird durch Ausplattieren von zuvor dem Wirkstoff ausgesetzten planktonisch wachsenden Bakterien auf wirkstofffreiem Agar bestimmt. Sie wird als die Konzentration definiert, oberhalb derer nach der Inkubation keine koloniebildenden Einheiten auf der Agarplatte beobachtet werden können.<sup>[332]</sup> Diese Konzentration beschreibt die Abtötung der Bakterien. Bei der Bestimmung der Endpunkte werden intervall-zensierte Daten ermittelt.<sup>[425–428]</sup> Die endliche Anzahl an Messpunkten lässt nur die Bestimmung eines Konzentrationsintervalls zu, in dem die minimalen inhibierenden und bakteriziden Konzentrationen liegen. Bei Zytotoxizitätstest wird die Vitalität oder die Lebendzellzahl bestimmt. Die Vitalität wird dabei anhand des Metabolismus, des Zellzyklus oder der Morphologie quantifiziert.<sup>[429,430]</sup>

Die Unterschiede der Messgrößen erschweren die Vergleichbarkeit toxikologischer Daten. Insbesondere die Unterschiede zwischen der Zellzahl adhärenter und planktonischer eukaryotischer Zellen (Zellen pro Fläche und Zellen pro Volumeneinheit) im Vergleich zur Zelldichte planktonischer Bakterien (Zellen pro Volumeneinheit) verändern sich während der Inkubation stark, und die Angabe einer Dosis lässt sich aufgrund der Unterschiede im Zellzyklus und der Generationszeit nicht vereinheitlichen. Die Größenunterschiede zwischen eukaryotischen und prokaryotischen Zellen und der damit verbundene Unterschied in der spezifischen Zelloberflächen bewirken zusätzlich ein unterschiedliches Adsorptionsverhalten von Fremdkörpern, wie z.B. Nanopartikeln, an den Zellen und von Zellen an Oberflächen.

In einigen Veröffentlichungen werden der Morphologie und Größe von Nanopartikeln mit der beobachteten biologischen Wirkung in Verbindung gebracht.<sup>[171,412,413]</sup> So zeigen etwa kleinere Silber-Nanopartikel eine größere biologische Wirkung als große Silber-Nanopartikel, wobei der Anteil von freien Silberionen hierbei nicht berücksichtigt wurde. Kleine Silber-Nanopartikel lösen sich schneller auf als größere Nanopartikel.<sup>[178,182,384,431]</sup> Kittler *et al.* beobachteten einen deutlichen toxischen Effekt von gealterten Silber-Nanopartikeln im Vergleich zu frisch synthetisierten oder unter Ausschluss von Sauerstoff gelagerten Nanopartikeln.<sup>[170]</sup> Die biologische Aktivität von Silber wird in erster Linie der Freisetzung von Silberionen und deren Wechselwirkung mit biologischen Systemen und weniger einem Partikeleffekt zugeschrieben.<sup>[420,432,433]</sup> Dabei zeigen silberhaltige Dispersionen je nach Anwesenheit freier Silberionen stark unterschiedliche Zytotoxizitäten und antibakterielle Wirkungen.

Die Mechanismen der Toxizität von Silberionen bei prokaryotischen Zellen sind vielfältig. So wurden Schäden der DNA<sup>[178,181,434,435]</sup>, die Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies<sup>[178,181,436]</sup>, Brüche der Zellmembranen<sup>[414,435,437]</sup> und die Interaktion mit Proteinen wie

den Untereinheiten der Ribosomen beobachtet.<sup>[178,181,438]</sup>

Die zytotoxische Wirkung von Silberionen auf Eukaryoten wird auf ähnliche Mechanismen zurückgeführt. Eukaryotische Zellen zeigen Schäden der DNA<sup>[439,440]</sup>, Anomalien der Chromosomen<sup>[439]</sup>, die Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies<sup>[421,439]</sup>, Brüche in der Cytoplasmamembran<sup>[172]</sup>, verringerte Aktivität der Mitochondrien und Abnahme der Gesamtproteinmenge<sup>[165]</sup>. Im subtoxischen Bereich wird eine erhöhte oder verminderte Freisetzung von Zytokinen<sup>[418]</sup> und eine Freisetzung von Cystein und Gluthation in das Nährmedium<sup>[441]</sup> beobachtet.

Die therapeutische Bandbreite eines Wirkstoffs gibt Aufschluss über die Eignung für eine therapeutische Anwendung. Bei der Betrachtung der toxischen Wirkung von Silber in der klinischen Anwendung müssen zwei verschiedene Fälle berücksichtigt werden. Im Falle einer antibakteriellen Wundauflage oder eines temporär applizierten medizinischen Materials besteht nicht zwingend ein direkter Kontakt mit infiziertem Gewebe. Das Silber in der Wundauflage soll in erster Linie eine Besiedlung der Oberfläche mit Mikroorganismen verhindern. Eine Freisetzung von Silber in die Wunde ist nicht beabsichtigt. Bei diesem Szenario steht die Wechselwirkung der silberhaltigen Wundauflage mit adsorbierten Mikroorganismen im Vordergrund. Bei der Anwendung eines silberhaltigen Wirkstoffstoffträgersystems in direktem Kontakt mit bakteriell infiziertem Gewebe, beispielsweise in Form eines Implantates oder einer Wundsalbe, sind die Zellen und Bakterien in einem nahezu gleichen Milieu. Für dieses Szenario sind die Zellen und Bakterien gleichen Silberspezies ausgesetzt. Für dieses Szenario müssen biologisch wirksame Konzentrationen für eukaryotische und prokaryotische Zellen unter gleichen äußeren Bedingungen ermittelt werden.

Studien zur Ermittlung von toxischen Konzentration von Silberionen, Silberverbindungen und Silber in metallischer Form unter weitestgehend konstanten Bedingungen gegenüber Bakterien und menschlichen Zellen sind bisher kaum durchgeführt worden.<sup>[411,442]</sup>

Die Daten zeigen, dass eine therapeutische Bandbreite von Silber in ionischer Form oder als silberdotierte Calciumphosphat-Nanopartikel nicht existiert.<sup>[410,411,442]</sup> Das umgebende Medium zeigt einen großen Einfluss auf die Toxizität von Silber in partikulärer oder gelöster Form.<sup>[145,319,443,444]</sup> In Abschnitt 5.5 wird der Einfluss der Zellkulturmedien auf Silberionen näher diskutiert.

## 5.5 Aktivität von Silberionen in biologischen Medien

Die Aktivität von Silber in biologischen Medien wird durch die Anwesenheit von anorganischen und organischen Ionen und komplexen organischen Liganden, wie Aminosäuren und Proteinen, bestimmt.<sup>[145,319]</sup> Der Einfluss von Ionen und anderen Liganden, welche sehr unterschiedliche Affinitäten zu Silberionen, Silberverbindungen und metallischem Silber haben, lässt sich in einem komplexen Medium wie RPMI mit 10 % FCS (V/V) experimentell nicht genau erfassen.

Der Begriff der Aktivität wird in der Biologie und Chemie unterschiedlich definiert. Während in der Chemie die Aktivität eine thermodynamische Größe darstellt, welche die effektive Konzentration eines Stoffes und damit sein chemisches Potential beschreibt, wird in der Biologie unter dem Begriff der Aktivität eines Stoffes die biologische Wirkung verstanden.<sup>[445,446]</sup> Die chemische Aktivität eines reinen Stoffes kann durch Reaktion mit anderen Stoffen unter Bildung schwerlöslicher Verbindungen beeinflusst werden. Die Löslichkeit eines Stoffes wird als Gleichgewichtskonzentration angegeben. Diese Gleichgewichtskonzentration gilt in einem geschlossenen System. Es kann ein Energieaustausch mit der Umgebung stattfinden. Die Masse des Systems bleibt konstant.<sup>[445]</sup>

Die biologische Wirkung ist keine thermodynamische Größe, da sich lebende Systeme nicht im thermodynamischen Gleichgewicht befinden.<sup>[447,448]</sup> Im Falle der biologischen Aktivität von Silber gegenüber Zellen oder Bakterien wird eine Reaktion auf zellulärer Ebene beobachtet. Geeignete Parameter sind dabei die Zellvitalität oder das Wachstum.<sup>[446]</sup>

Da die biologische Wirkung von Silber den Silberionen zugeschrieben wird und Partikeleffekte nur bei sehr kleinen Nanopartikeln beobachtet werden, ist es entscheidend, inwieweit Silberionen für Wechselwirkungen mit biologischen Systemen verfügbar sind. Die verfügbare Konzentration ist abhängig von der Zusammensetzung des Zellkulturmediums.<sup>[135]</sup> Analog zur chemischen Definition der effektiven Konzentration kann die effektive biologisch wirksame Konzentration ein Maß der biologischen Aktivität sein. Die Wechselwirkung von Silberionen mit lebenden Organismen in einer Zellkultur unterliegt keinem Gleichgewichtszustand, da auf zellulärer Ebene ein ständiger Stoff- und Energieaustausch stattfindet. Über die Dauer des Experiments wird kein Gleichgewichtszustand erreicht. Die Berechnungen der Gleichgewichtskonzentrationen von Silberspezies in biologischen Medien liefern jedoch in erster Näherung eine Größenordnung des Anteils von gelöstem Silber. Die ermittelten Konzentrationen lassen sich damit zum Abschätzen der biologischen Verfügbarkeit von gelöstem Silber heranziehen.

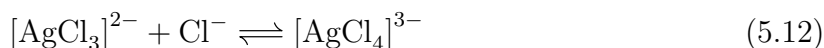
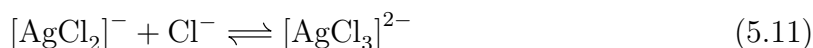
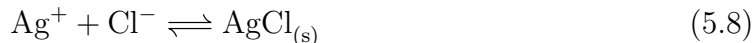
Im Folgenden wird die Konzentration an gelöstem Silber in Form freier Silberionen und löslicher Silberkomplexe unter Berücksichtigung der anorganischen Komponenten des Zell-



nährmediums RPMI mit Zusatz von 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES) diskutiert. Die Gleichgewichtskonzentrationen wurden mit der Software *Visual Minteq* berechnet (Abschnitt 3.16).<sup>[313]</sup>

Die für die Berechnung verwendeten Parameter (Silberkonzentration, Temperatur, CO<sub>2</sub>-Partialdruck, Ionenstärke und pH-Wert) wurden entsprechend der durchgeführten biologischen Experimente gewählt. Die in den biologischen Experimenten untersuchten Silberkonzentrationen betrugen  $1,25 \cdot 10^{-4} \text{ g L}^{-1}$  ( $1,159 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ) bis  $1,00 \cdot 10^{-2} \text{ g L}^{-1}$  ( $9,270 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ). Der Einfluss der Temperatur wurde im Bereich von  $T=0$  bis  $40 \text{ }^{\circ}\text{C}$  untersucht. Die Zusammensetzung des Mediums wurde für die Berechnungen entsprechend der biologischen Experimente um 10 % (V/V) verdünnt.

In allen Berechnungen wurde ausschließlich die Präzipitation von festem Silberchlorid ermittelt. Die in biologischen Medien zu erwartenden relativen Anteile der Silberspezies als Funktion der absoluten Silberkonzentration sind in Abbildung 5.32 für  $T=0 \text{ }^{\circ}\text{C}$  (**A**) und für  $T=37 \text{ }^{\circ}\text{C}$  (**B**) gezeigt. Silber geht in erster Linie in Form geladener Chlorokomplexe entsprechend der Gleichungen 5.8 bis 5.12 in Lösung. Darüber hinaus existiert auch die solvatisierte ungeladene Spezies  $\text{AgCl}_{(\text{aq})}^0$ .<sup>[163,166,168,179,316,412,436,449–453,453–458]</sup>



$$K_L = c[\text{Ag}^+] \cdot c[\text{Cl}^-] = 1,77 \cdot 10^{-10} \text{ mol}^2 \text{ L}^{-2} \quad (25 \text{ }^{\circ}\text{C})^{[459–463]} \quad (5.13)$$

$$L = \sqrt{K_L} = \sqrt{c[\text{Ag}^+] \cdot c[\text{Cl}^-]} = 1,33 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1} \quad (5.14)$$

Das Löslichkeitsprodukt ( $K_L$ ) von Silberchlorid bei Standarddruck und  $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$  ist in Gleichung 5.13 angegeben. Die Löslichkeit ( $L$ ) von Silber ergibt sich daraus für  $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$  entsprechend Gleichung 5.14. Weder das Löslichkeitsprodukt noch die Löslichkeit geben Auskunft über lösliche höher koordinierte Silberspezies. Die Löslichkeit von Silberchlorid zeigt darüber hinaus eine ausgeprägte Temperaturabhängigkeit.

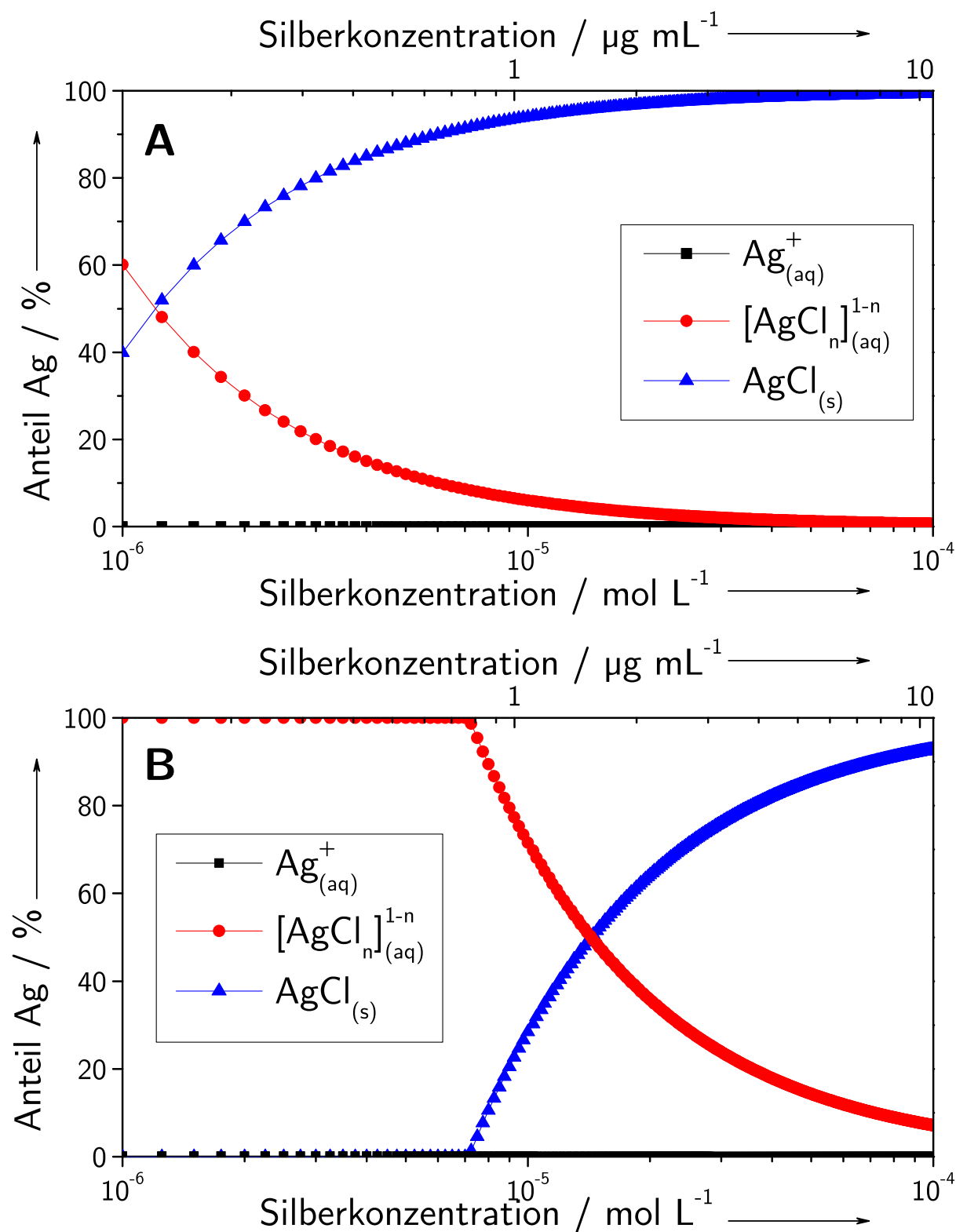
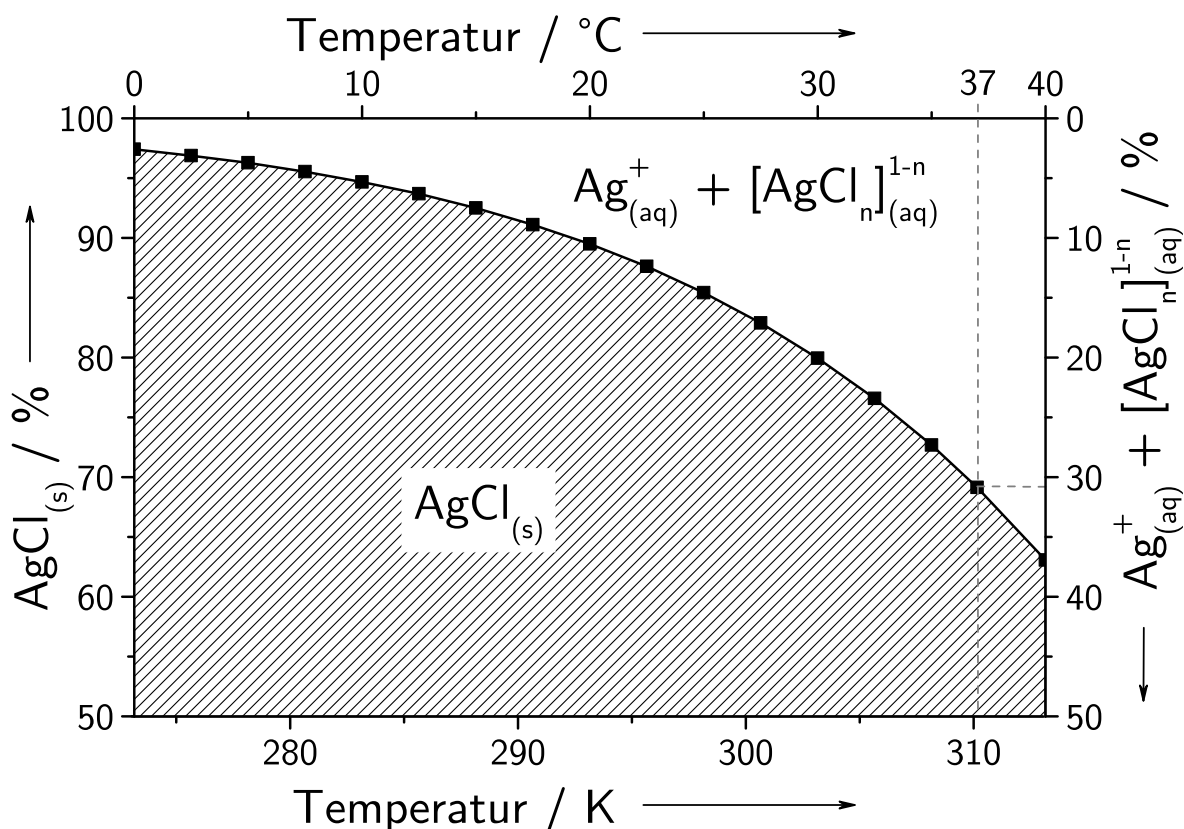


Abb. 5.32: Silberspezies in RPMI-Medium bei 0 °C (A) und 37 °C (B) als Funktion der Silberkonzentration. Die Chloridkonzentration beträgt 0,087 mol L<sup>-1</sup>.

In Abbildung 5.33 sind die Anteile von Silber in gelöster Form ( $\text{Ag}^+ + [\text{AgCl}_n]^{1-n}$ ) in RPMI-Medium bei einer Silberkonzentration von  $2,5 \mu\text{g mL}^{-1}$  als Funktion der Temperatur aufgetragen. Bei dieser Darstellung handelt es sich um eine Art Phasendiagramm. Oberhalb der Kurve liegt Silber in gelöster Form als Chlorokomplex oder zu einem geringen Anteil als freies Ion vor. Unterhalb der Kurve fällt Silber als festes Silberchlorid aus.



**Abb. 5.33:** Silberspezies in RPMI-Medium als Funktion der Temperatur bei einer Silberkonzentration von  $2,5 \mu\text{g mL}^{-1}$  ( $2,318 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ).

Es zeigt sich, dass bei  $37^{\circ}\text{C}$  31 % der Silberionen in Form löslicher Komplexe vorliegen. Es sei darauf hingewiesen, dass es sich bei dieser Darstellung um ein Zustandsdiagramm mit der Temperatur als einziger Variablen handelt.

Die Chloridkonzentrationen für die Zellnährmedien sind in Tabelle 5.10 aufgelistet. Die komplexen Bestandteile (fetales Kälberserum, Trypton und Hefeextrakt) variieren je nach Ursprung in ihren Chloridkonzentrationen. Die Chloridkonzentration liegt in fetalem Kälberserum bei  $0,100 \pm 0,002 \text{ mol L}^{-1}$  (Life Technologies). Der Chloridanteil in Trypton und Hefeextrakt (Sigma Aldrich) liegt bei  $\leq 1 \%$  der Trockenmasse und beeinflussen die

absoluten Chloridkonzentrationen unwesentlich.

**Tab. 5.10:** Chloridkonzentrationen in biologischen Medien. Die Chloridkonzentration in RPMI mit 10 % FCS (V/V) und in LB Broth können aufgrund der komplexen Bestandteile (Trypton und Hefeextrakt) nicht genau angegeben werden.

	Chloridkonzentration / mol L <sup>-1</sup>	
	unverdünnt	10 % (V/V) verdünnt
LB Broth (5 g L <sup>-1</sup> NaCl)	≈ 0,086	≈ 0,077
LB Broth (10 g L <sup>-1</sup> NaCl)	≈ 0,171	≈ 0,154
DMEM	0,121	0,109
RPMI	0,097	0,087
RPMI + 10 % FCS	≈ 0,097	≈ 0,087

In LB Broth-Medium lässt sich unter Vernachlässigung des komplexen Anteils anhand der Natriumchloridkonzentration der Anteil an gelöstem Silber berechnen. Bei einer Silberkonzentration von 2,5 µg mL<sup>-1</sup> liegen 27,32 % des Silbers in Form löslicher Chlorokomplexe vor.

Zook *et al.* berechneten die Silberspezies ausgehend von AgNO<sub>3</sub> als Model für Silber-Nanopartikel in *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) mit der Software *Geochem-EZ*.<sup>[457,464,465]</sup> Für 5 µg mL<sup>-1</sup> ergeben sich nach diesem Modell eine Fällung des Silbers als festes Silberchlorid mit einem Anteil von 96,4 %. Die Temperaturabhängigkeit der Stabilitätskonstanten wird in der Software *Geochem-EZ* nicht berücksichtigt und die Gleichgewichtskonstanten sind nicht referenziert.

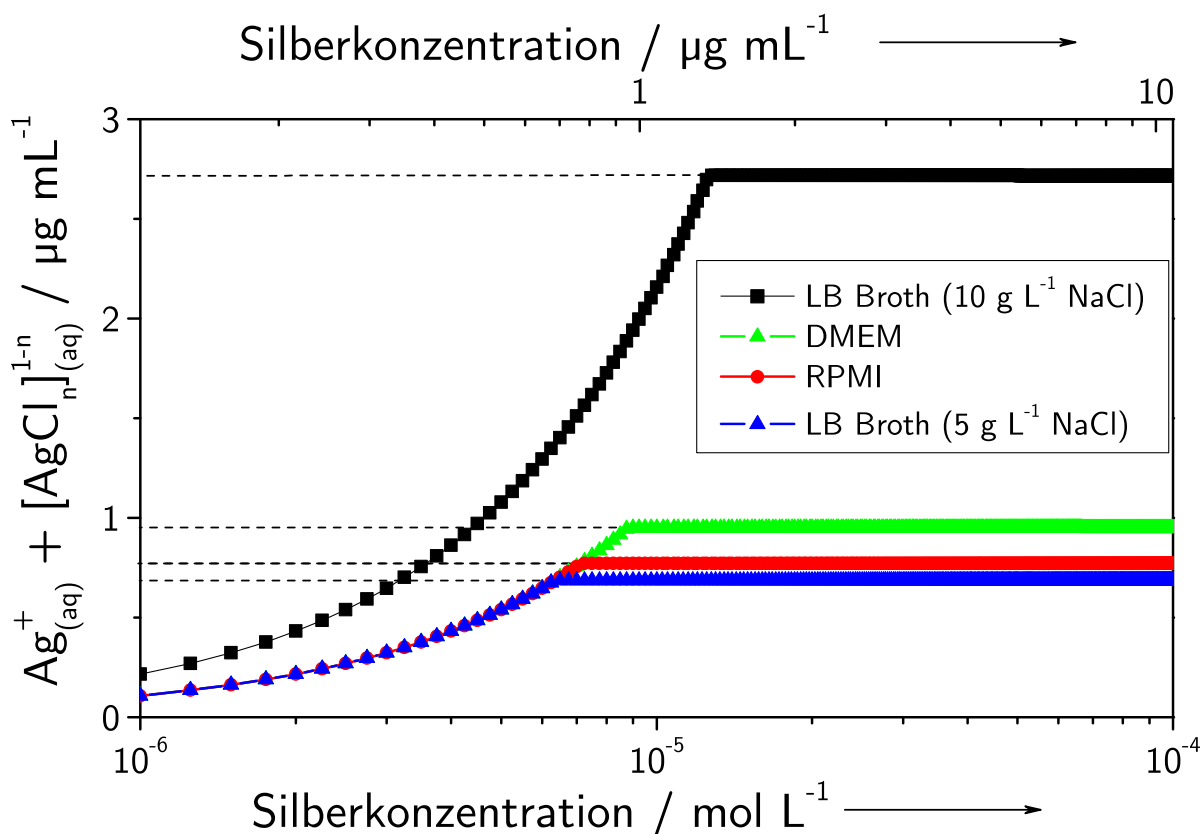
*Visual Minteq* korrigiert die Temperaturabhängigkeit der Gleichgewichtskonstanten anhand von Literaturdaten oder berechnet die Temperaturabhängigkeit anhand der van't Hoff Reaktionsisobaren (Gleichung 5.16) durch Integration über die reziproke Temperatur (Gleichung 5.17). Die van't Hoff Gleichung lässt sich aus der Gibbs-Helmholtz-Gleichung durch Substitution von  $\Delta_R G^\circ$  entsprechend Gleichung 5.15 herleiten.

$$\Delta_R G^\circ = -RT \ln K \quad (5.15)$$

$$\frac{d \ln K}{d\left(\frac{1}{T}\right)} = -\frac{\Delta_R H^\circ}{R} \quad (5.16)$$

$$\ln K_T = \ln K_{298,15} - \frac{\Delta_R H^\circ}{R} \left( \frac{1}{298,15 \text{ K}} - \frac{1}{T} \right) \quad (5.17)$$

Die Annahme der Temperaturunabhängigkeit der Reaktionsenthalpie ( $\Delta H$ ) gilt für niedrige Temperaturen hinreichend genau. Entsprechend lässt sich für eine Silberkonzentration von  $5 \mu\text{g mL}^{-1}$  in Form von  $\text{AgNO}_3$  in DMEM mit *Visual Minteq* eine Fällung der Silberionen bei  $37^\circ\text{C}$  zu 77,46 % berechnen. Die Sättigungskonzentrationen für lösliche Silberspezies liegen in RPMI bei  $7,909 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  ( $0,85 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) und in DMEM bei  $1,045 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  ( $1,13 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Andere schwerlösliche Spezies wie Silberorthophosphat ( $\text{Ag}_3\text{PO}_4$ ) fallen nach diesen Berechnungen in keinem der Medien aus.



**Abb. 5.34:** Sättigungskonzentrationen löslicher Silberspezies in um 10 % (V/V) mit Reinstwasser verdünntem RPMI, DMEM und LB Broth bei  $37^\circ\text{C}$ .

Unter Berücksichtigung der Verdünnung wird in RPMI bei  $37^\circ\text{C}$  eine Sättigung von  $0,77 \mu\text{g mL}^{-1}$  löslichem Silber erhalten. Bei DMEM stellt sich eine Sättigungskonzentration von  $0,95 \mu\text{g mL}^{-1}$  gelöster Silberspezies ein. Die Sättigungskonzentration löslicher Silberspezies in LB Broth-Medium liegt bei  $0,68 \mu\text{g mL}^{-1}$  ( $5 \text{ g L}^{-1} \text{ NaCl}$ ) und  $2,72 \mu\text{g mL}^{-1}$  ( $10 \text{ g L}^{-1} \text{ NaCl}$ ). Die Sättigungskonzentrationen für Silber in löslicher Form ( $\text{Ag}^+ + [\text{AgCl}]^{1-n}$ ) sind für die um 10 % (V/V) mit Reinstwasser verdünnten Zellkulturmedien RPMI, DMEM und LB Broth bei  $37^\circ\text{C}$  in Abbildung 5.34 dargestellt. Im Falle von

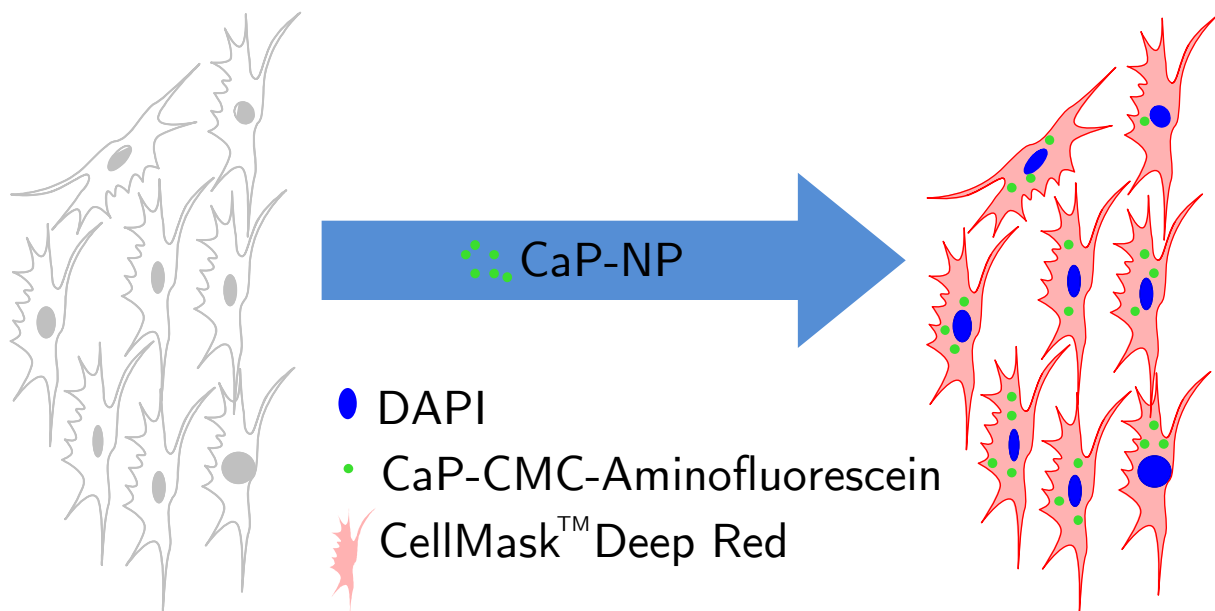
LB Broth wurde nur der Anteil an Natriumchlorid zur Berechnung herangezogen. Inwieweit Silberionen durch Komplexierung weiterer Liganden wie Aminosäuren und Proteinen und durch biologische Prozesse aus dem Gleichgewicht entfernt werden, lässt sich nicht abschätzen. Insbesondere Thiofunktionen von Aminosäuren stellen eine potenzielle Senke für Silberionen dar.<sup>[454,466–470]</sup> Die Berechnungen unter Berücksichtigung organischer Liganden nach dem *Biotic Ligand*-Modell zeigen eine sehr hohe Affinität von Silber gegenüber Thiol-Liganden in wässrigen Systemen. Derartige Berechnungen lassen sich aufgrund der unbekannten Zusammensetzung der Komplexmedien nicht durchführen. Der Einfluss des Zellnährmediums auf die Ermittlung biologisch wirksamer Konzentrationen ist demnach zu berücksichtigen, sollen toxikologische Daten miteinander verglichen werden.

Bei hohen Silberkonzentrationen ( $\approx 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ) wird zwar in biologischen Medien ein Großteil der Silberionen in Form von festem Silberchlorid gefällt<sup>[453]</sup>, die lösliche Fraktion in Form von Chlorokomplexen liegen jedoch im Bereich von  $\approx 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  ( $\approx 1 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Die toxischen Konzentrationen von Silberionen in Form von Silberacetat und silberdotierten Calciumphosphat-Nanopartikeln gegenüber Bakterien und humanen Zellen in *in vitro* liegen in einem sehr ähnlichen Bereich (0,5 bis 5,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ).<sup>[410,411,442]</sup> Die biologischen Wirkungen von Silberkonzentrationen oberhalb von  $\approx 1 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$  sollten durch die Fällung von Silberchlorid die gleichen Effekte zeigen. Biologische Effekte wurden zum Teil allerdings erst bei Silberkonzentrationen oberhalb von  $1 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$  beobachtet. Diese Tatsache beweist, dass die Wirkmechanismen sehr komplex sind und nicht nur über die Fällung von Silberchlorid erklärt werden können. Die unterschiedlichen toxischen Wirkungen der einzelnen Silberspezies auf die untersuchten Organismen, insbesondere im Vergleich von Prokaryoten und Eukaryoten, heben die Wichtigkeit einheitlicher Versuchsbedingungen hervor.<sup>[145,410]</sup>

## 5.6 Endozytose von F-CMC-stabilisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln

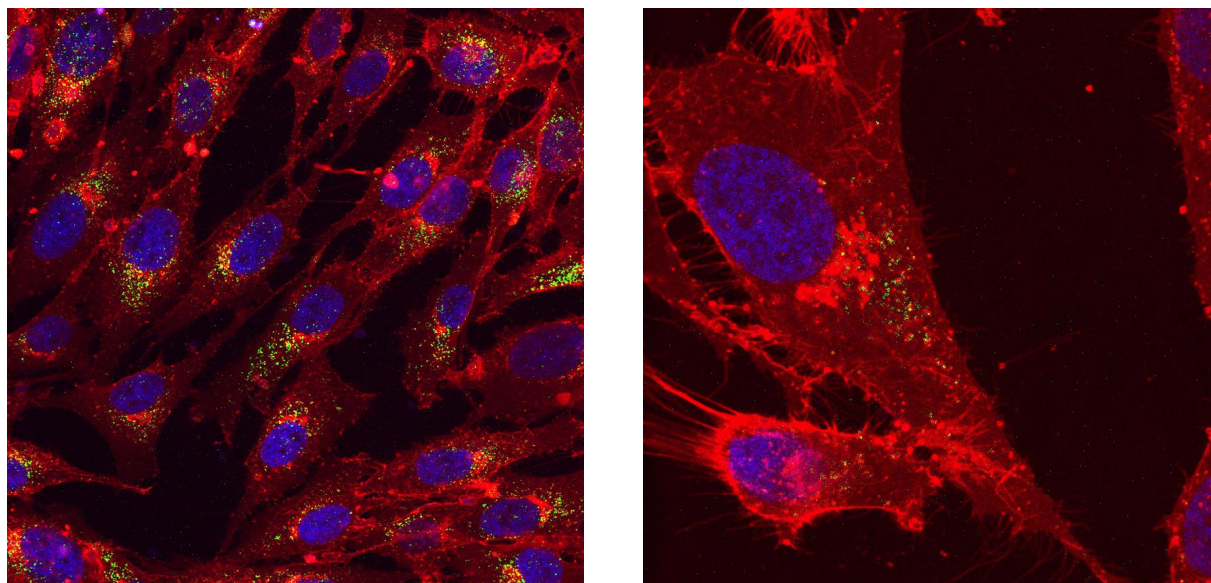
### 5.6.1 Humane osteosarkome Zelllinie MG-63

MG-63-Zellen wurden mit grün fluoreszierenden F-CMC-stabilisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln inkubiert. Die Aufnahme der Partikel wurde mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie nach 4 stündiger Inkubation bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> untersucht. Die Zellkerne wurden mit DAPI und die Zellmembranen mit CellMask<sup>TM</sup> Deep Red angefärbt. Das Färbeschema ist in Abbildung 5.35 dargestellt.



**Abb. 5.35:** Färbeschema für die konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie von MG-63 Osteoblasten-ähnlichen Zellen. Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) und die Cytoplasmamembranen mit Deep Red<sup>TM</sup> (rot) angefärbt. Die grüne Fluoreszenz der F-CMC-stabilisierten Calciumphosphat-Nanopartikel kann nach endozytotischer Aufnahme der Nanopartikel in Stack-Aufnahmen beobachtet werden.

Bei der Auswertung der axialen Bildstapel (*z-stack*) konnte die grüne Fluoreszenz der Nanopartikel fein verteilt nahe der Zellkerne im Inneren der Zellen beobachtet werden (Abbildung 5.36). Die Nanopartikel werden demnach nicht als größere Aggregate, sondern als disperse Partikel aufgenommen. Eine Akkumulation in größeren Kompartimenten wurde nicht beobachtet. Außerhalb der Zellen und bei Zellen, die mit CMC-stabilisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln inkubiert wurden, wurde keine Fluoreszenz detektiert.

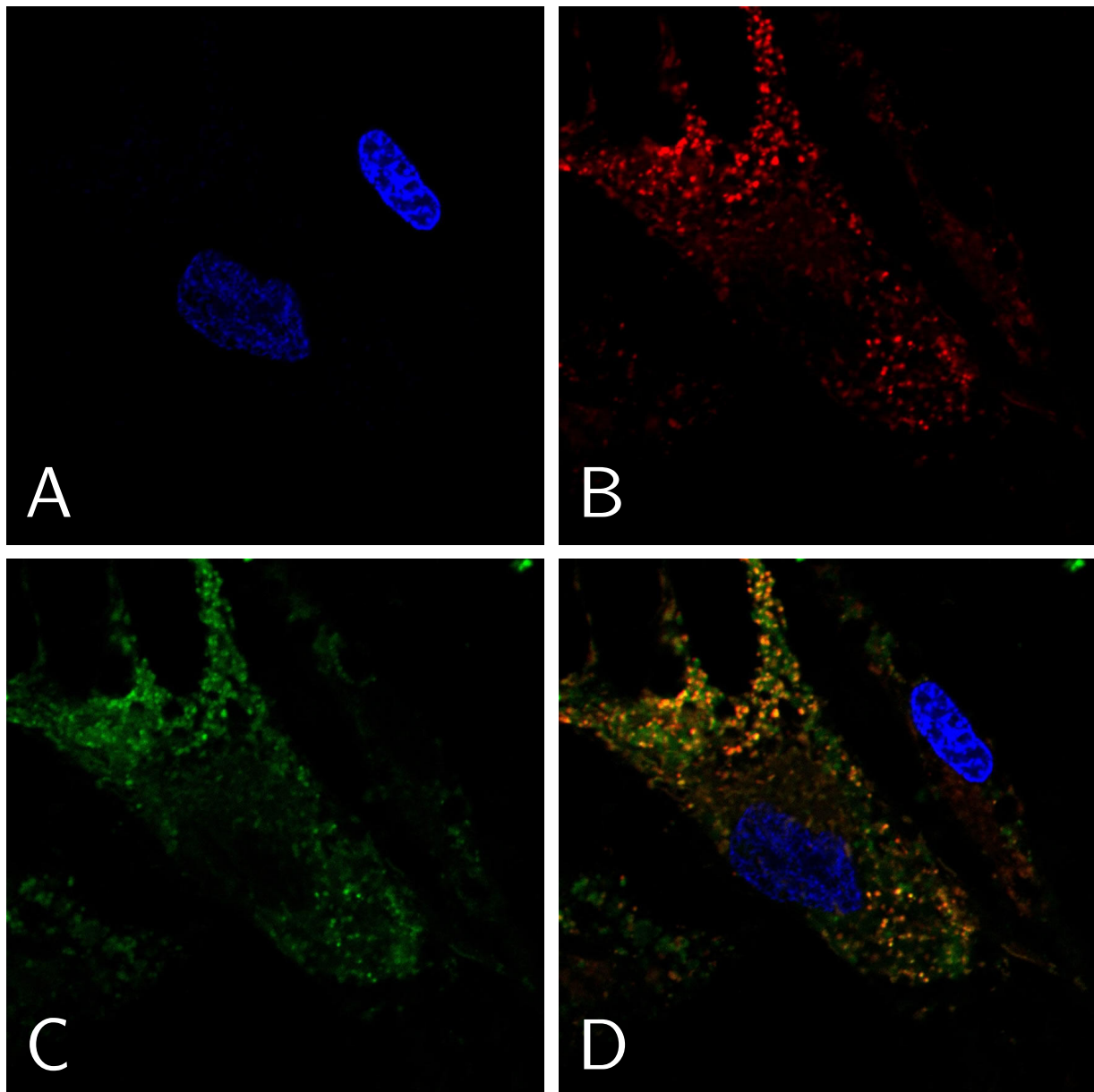


**Abb. 5.36:** CLSM-Aufnahme von MG-63-Zellen nach 4-stündiger Inkubation mit F-CMC-stabilisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln. Die Zellmembranen sind mit CellMask<sup>TM</sup> Deep Red (rot) und die Zellkerne mit DAPI (blau) angefärbt.

### 5.6.2 Humane mesenchymale Stammzellen

Die Zellaufnahme von F-CMC-stabilisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln durch humane mesenchymale Stammzellen wurde mittels CLSM und Durchflusszytometrie untersucht. CLSM-Aufnahmen der Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit F-CMC-stabilisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln zeigten eine hohe Aufnahme der Nanopartikel in die Zellen (Abbildung 5.37). Anhand der Überlagerung der Aufnahmen **A** bis **C** lässt sich erkennen, dass nach 24-stündiger Inkubation die Calciumphosphat-Nanopartikel größtenteils in den Endosomen und Lysosomen eingeschlossen sind. Die entsprechenden Bereiche sind in Aufnahme **D** orange-braun gefärbt. Die Fluoreszenz der Nanopartikel erstreckt sich über Lysosomen im gesamten Zytoplasma der Zellen, wobei nahe der Cytoplasmamembran vermehrt Vesikel zu finden sind. Neben den membrannahen Vesikeln lässt sich auch grüne Fluoreszenz im Zytoplasma der Zellen erkennen. Diese könnte durch an der Zytoplasmamembran adsorbierte und nicht endozytosierte Calciumphosphat-Nanopartikel erklärt werden. Außerhalb der Zellen und in Zellen, die mit CMC-stabilisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln inkubiert wurden, konnte keine Fluoreszenz beobachtet werden.



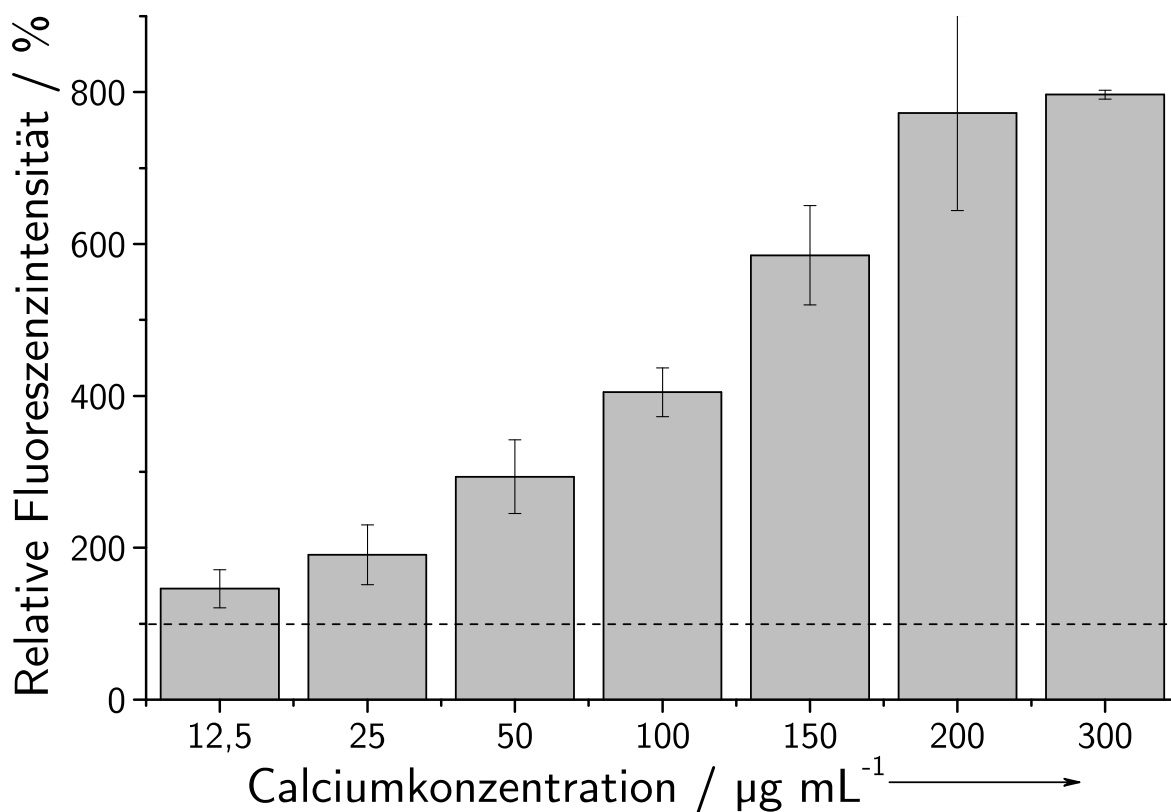


**Abb. 5.37:** CLSM von hMSCs nach der Inkubation mit F-CMC-stabilisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln. Die Zellkerne sind mit Hoechst 33342 (**A**) und die Endosomen und Lysosomen mit *Lyso Tracker*<sup>®</sup> Red DND-99 (**B**) angefärbt. Aufnahme **C** zeigt die Fluoreszenz der F-CMC-stabilisierten Calciumphosphat-Nanopartikel. Eine Überlagerung der Aufnahmen **A** bis **C** ist in **D** zu sehen.

Bei der Durchflusszytometrie lässt sich die Endozytose anhand der relativen Fluoreszenzintensität im Vergleich zu hMSCs, die mit CMC-stabilisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln inkubiert wurden, quantifizieren. Die relative Fluoreszenzintensität, normiert auf die Calciumkonzentration, ist als Funktion der Partikelkonzentration in Abbildung 5.38

dargestellt. Die gestrichelte Linie gibt die Autofluoreszenz der Zellen nach der Inkubation mit CMC-stabilisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln an. Es lässt sich eine konzentrationsabhängige Aufnahme der Nanopartikel erkennen.

Ab einer Partikelkonzentration entsprechend einer Calciumkonzentration von  $200 \mu\text{g mL}^{-1}$  wird eine Sättigung in der Zellaufnahme erreicht. Die getesteten Partikelkonzentrationen liegen im Bereich der in Abschnitt 5.4.2 verwendeten Calciumkonzentrationen und zeigten keinen Abnahme der Zellvitalität. Aufgrund des geringen Substitutionsgrades ist nicht davon auszugehen, dass sich CMC- und F-CMC-stabilisierte Calciumphosphat-Nanopartikel chemisch stark unterscheiden. Eine unterschiedliche biologische Wirkung hinsichtlich der Zellaufnahme ist demnach unwahrscheinlich. Die höchsten in Abschnitt 5.4.2 eingesetzten Partikelkonzentrationen stellen demnach auch die maximale Aufnahme der CMC-stabilisierten Calciumphosphat-Nanopartikel dar.



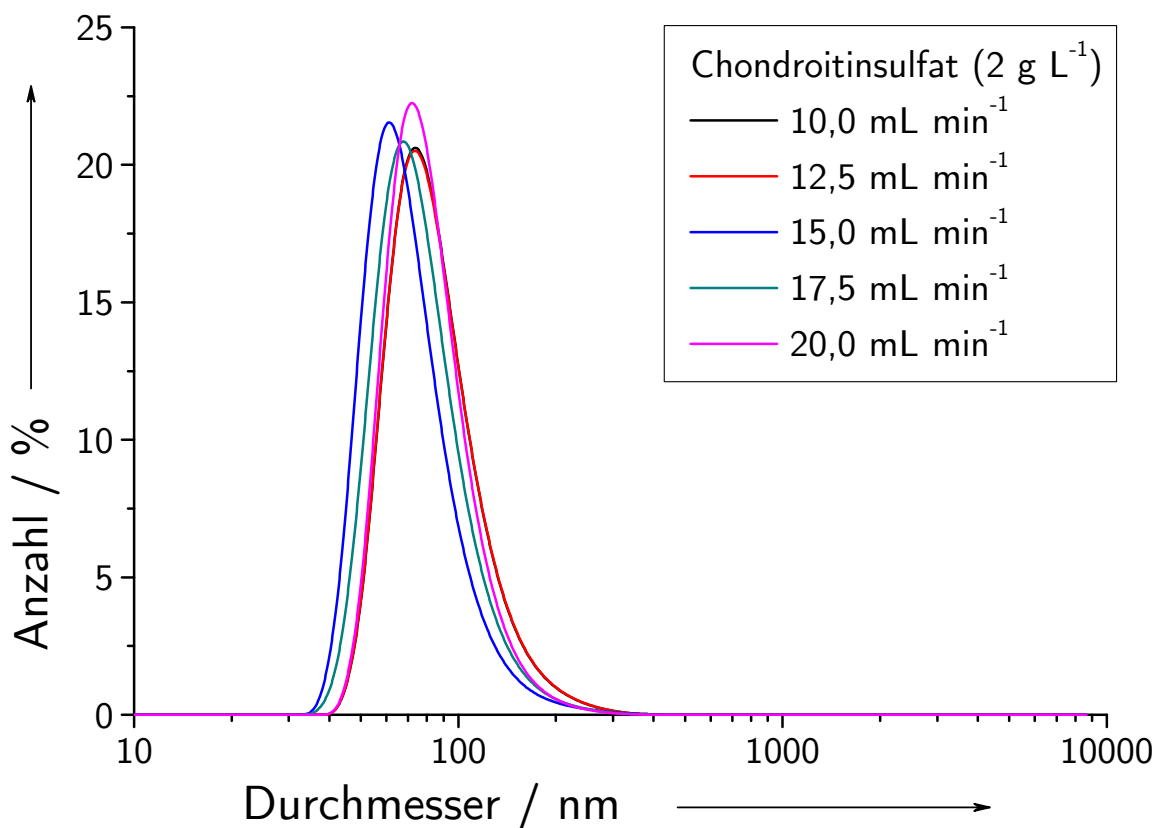
**Abb. 5.38:** Durchflusszytometrische Bestimmung der Zellaufnahme von F-CMC-stabilisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln in hMSCs ( $N=3$ ).

Zellen besitzen effiziente Efflux-Systeme, um die intrazellulären Ionenkonzentrationen und damit die physiologischen osmotischen Verhältnisse konstant zu halten.<sup>[471,472]</sup> Neben Io-

nen können auch endozytosierte Makromoleküle, Nanopartikel und kleine Mikropartikel aus Zellen ausgeschleust werden (Exozytose).<sup>[54,95,96,473–480]</sup> Im Gegensatz zu Ionenpumpen oder passivem Membrantransport über Carrierproteine oder Ionenkanäle werden Makromoleküle und Nanopartikel über sekretorische Vesikel aus dem Inneren der Zelle entfernt. Die Vesikel verschmelzen mit der Zellmembran und setzen die eingeschlossenen Stoffe in die extrazelluläre Matrix frei.<sup>[95,475]</sup> Kleine Partikel werden dabei schneller und in größerem Maße freigesetzt als große Partikel.<sup>[96,477,480,481]</sup> Entsprechend kann Carboxymethylcellulose in den Lysosomen Calciumionen komplexieren und als gelartige Matrix aus der Zelle entfernt werden. Die extra- und intrazellulären Calciumkonzentrationen steuern dabei die Exozytose.<sup>[30,482,483]</sup> Die maximale Aufnahme von Calciumphosphat-Nanopartikeln muss in diesem Kontext als dynamisches Gleichgewicht zwischen Endozytose, lysosomalem Abbau des Calciumphosphatkerns und Exozytose verstanden werden.<sup>[476,479,480,484]</sup>

## 5.7 Chondroitinsulfat-stabilisierte Calciumphosphat-Nanopartikel

Chondroitinsulfat-stabilisierte Calciumphosphat-Nanopartikel wurden durch einen kontinuierlichen Fällungsprozess synthetisiert (siehe Abschnitt 4.1). Der Volumenstrom im Rohrreaktor betrug  $50 \text{ mL min}^{-1}$  ( $\tau = 0,3 \text{ s}$ ). Der Volumenstrom der Chondroitinsulfat-Lösung ( $2 \text{ g L}^{-1}$ ) wurde zur Ermittlung geeigneter Polyelektrolytkonzentrationen in der Dispersion von  $5 \text{ mL min}^{-1}$  bis  $22,5 \text{ mL min}^{-1}$  variiert.



**Abb. 5.39:** Größenverteilung (DLS) von CS-stabilisierten Calciumphosphat-Nanopartikel-Dispersionen. Die Volumenströme der Calciumnitrat- und Diammoniumhydrogenphosphat-Lösungen waren in allen Versuchen mit jeweils  $25 \text{ mL min}^{-1}$  konstant (Verweilzeit  $\tau = 0,3 \text{ s}$ ). Die Chondroitinsulfatmenge wurde durch Volumenströme von 10 bis  $20 \text{ mL min}^{-1}$  variiert.

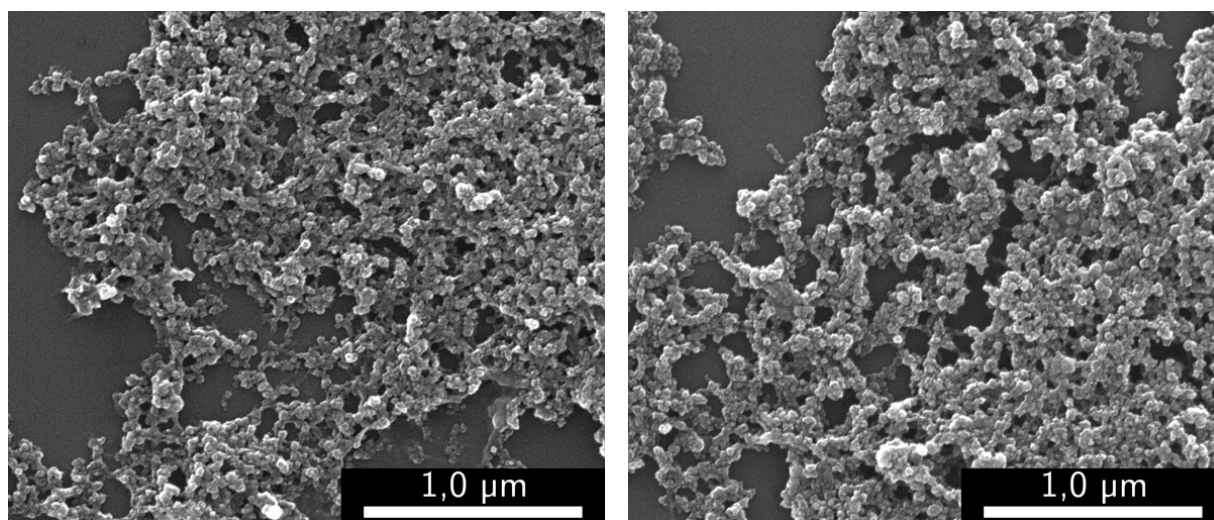
Die mittels Dynamischer Lichtstreuung gemessenen Größenverteilungen der hydrodynamischen Durchmesser für einige Volumenströme an Chondroitinsulfat-Lösung sind in Abbildung 5.39 nach der Anzahl aufgetragen. Die Maxima der Größenverteilungen lagen bei allen eingestellten Volumenströmen an Chondroitinsulfat-Lösung zwischen 61 und 75 nm.

Die *z-average*-Werte, die zugehörigen PDI und die Zetapotentiale für Volumenströme von 5 bis 22,5 mL min<sup>-1</sup> sind in Tabelle 5.11 zusammengefasst.

**Tab. 5.11:** Kolloidchemische Charakterisierung von CS-stabilisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln bei Variation der Chondroitinsulfat-Menge.

Chondroitinsulfat / mL min <sup>-1</sup>	nach der Synthese			redispersiert		
	<i>d</i> / nm	PDI	ζ / mV	<i>d</i> / nm	PDI	ζ / mV
5	173	0,167	-31,7	136	0,106	-24,6
7,5	171	0,163	-34,6	134	0,089	-22,1
10	172	0,181	-34,9	135	0,117	-27,4
12,5	167	0,166	-35,0	132	0,131	-20,7
15	166	0,153	-34,1	129	0,157	-21,8
17,5	169	0,200	-35,2	126	0,130	-20,9
20	166	0,180	-36,7	124	0,135	-24,2
22,5	162	0,168	-35,4	123	0,113	-23,7

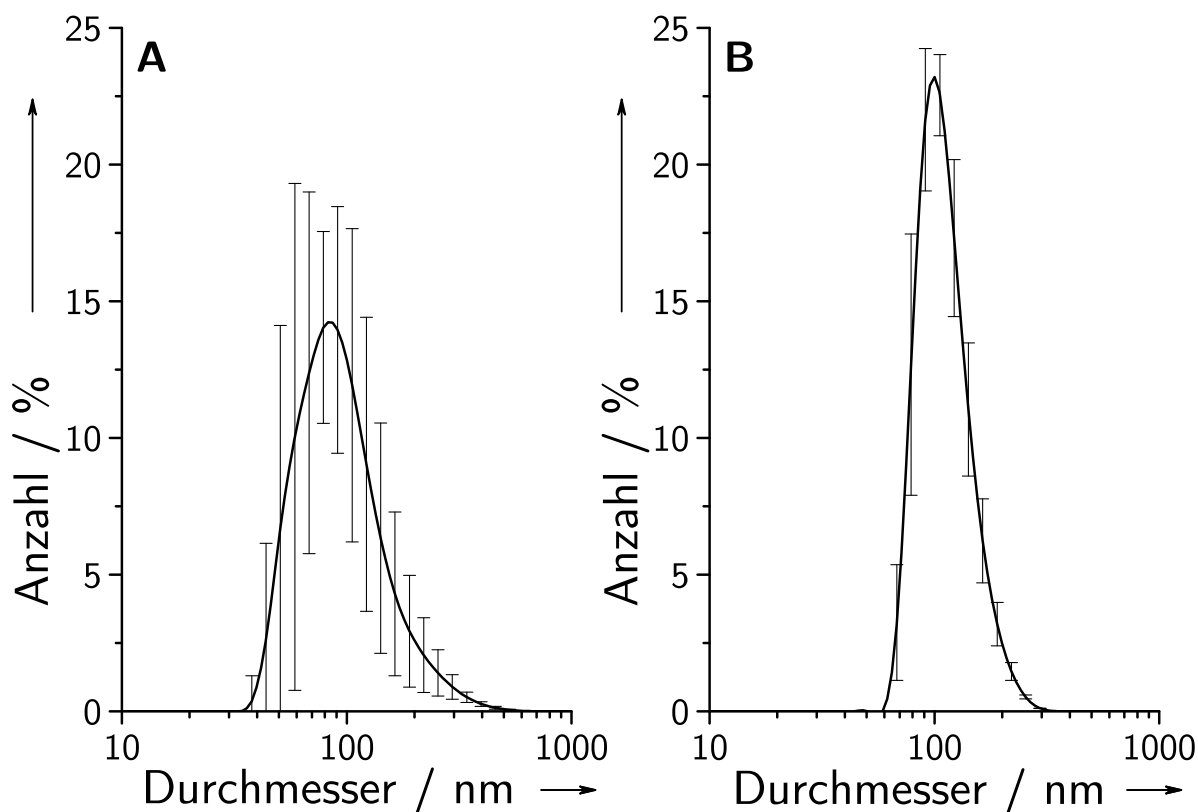
Mit steigendem Volumenstrom an Chondroitinsulfat-Lösung wurden kleinere mittlere hydrodynamische Durchmesser nach Zentrifugation und Redispersion erhalten. Die zugeführte Menge an CS zeigte keinen Einfluss auf das Zetapotential der Nanopartikel.



**Abb. 5.40:** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von CS-stabilisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln mit Volumenströmen an Chondroitinsulfat-Lösung von 10 mL min<sup>-1</sup> (links) und 20 mL min<sup>-1</sup> (rechts).

Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der mit CS-stabilisierten Calciumphosphat-Nanopartikel sind in Abbildung 5.40 für Volumenströme von  $10 \text{ mL min}^{-1}$  (links) und  $20 \text{ mL min}^{-1}$  (rechts) gezeigt. Es lassen sich kugelförmige Nanopartikel mit Durchmessern von 50 nm erkennen. Im Vergleich der rasterelektronenmikroskopisch und mit der Lichtstreuung ermittelten Durchmesser weichen die Werte nur geringfügig voneinander ab.

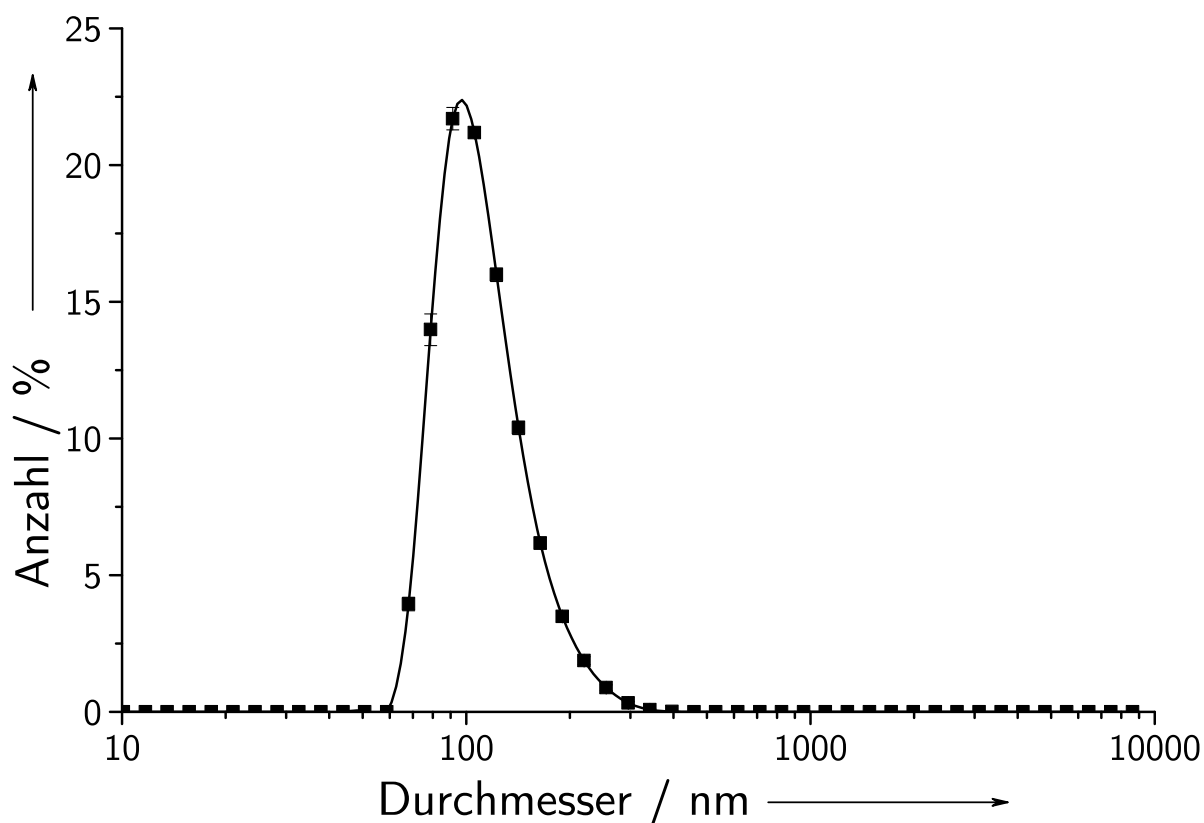
Die geringe Abweichung kann auf den geringen hydrodynamischen Durchmesser des Polyelektrolyten zurückgeführt werden. Im Vergleich zu Carboxymethylcellulose adsorbiert Chondroitinsulfat in einer flacheren Konformation an der Partikeloberfläche. Das Molekül ist aufgrund der stärker geladenen Sulfatfunktionen gestreckter als Carboxymethylcellulose und besitzt eine Persistenzlänge von 8 bis 14 nm.<sup>[257,485,486]</sup> Die stark negativ geladenen Sulfatfunktionen können dabei stärkere elektrostatische Wechselwirkungen mit Calciumionen an der Oberfläche der Calciumphosphat-Nanopartikel eingehen. Horkay *et al.* zeigten, dass auch in Gegenwart hoher Calciumkonzentrationen ( $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ ) keine Phasenseparation durch elektrostatische Wechselwirkung der Säurefunktionen mit Gegenionen auftreten.<sup>[486]</sup>



**Abb. 5.41:** Größenverteilungen (DLS) von CS-stabilisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln vor (A) und nach (B) zweifacher Zentrifugation, Redisperion in Reinstwasser, Zugabe von Trehalose-Dihydrat und Sterilfiltration.

Für zellbiologische Untersuchungen wurden CS-stabilisierte Calciumphosphat-Nanopartikel mit einem Volumenstrom der Chondroitinsulfat-Lösung von  $10 \text{ mL min}^{-1}$  und einer Verweilzeit im Rohrreaktor von  $\tau=0,3 \text{ s}$  hergestellt. Die erhaltenen Dispersionen wurden in Gegenwart von  $50 \text{ mg mL}^{-1}$  Trehalose-Dihydrat gefriergetrocknet. Die Größenverteilungen der Dynamischen Lichtstreuung (Auftragungen nach der Anzahl) sind in Abbildung 5.41 dargestellt. Die Maxima der Verteilungen lagen vor (A) und nach (B) zweifacher Zentrifugation, Redispersion in Reinstwasser, Zugabe von Trehalose-Dihydrat und Sterilfiltration bei 85 und 100 nm. Die frisch synthetisierten Dispersionen zeigten breite Größenverteilungen.

Durch die zweifache Zentrifugation und Redispersion in Reinstwasser konnte die Monodispersität der Dispersionen deutlich gesteigert werden, was in abnehmenden mittleren hydrodynamischen Durchmessern (*z-average*) und den kleineren Polydispersitätsindizes deutlich wird. Die Zugabe von Trehalose und die Sterilfiltration zeigten keinen Einfluss auf die Dispersität des Systems.

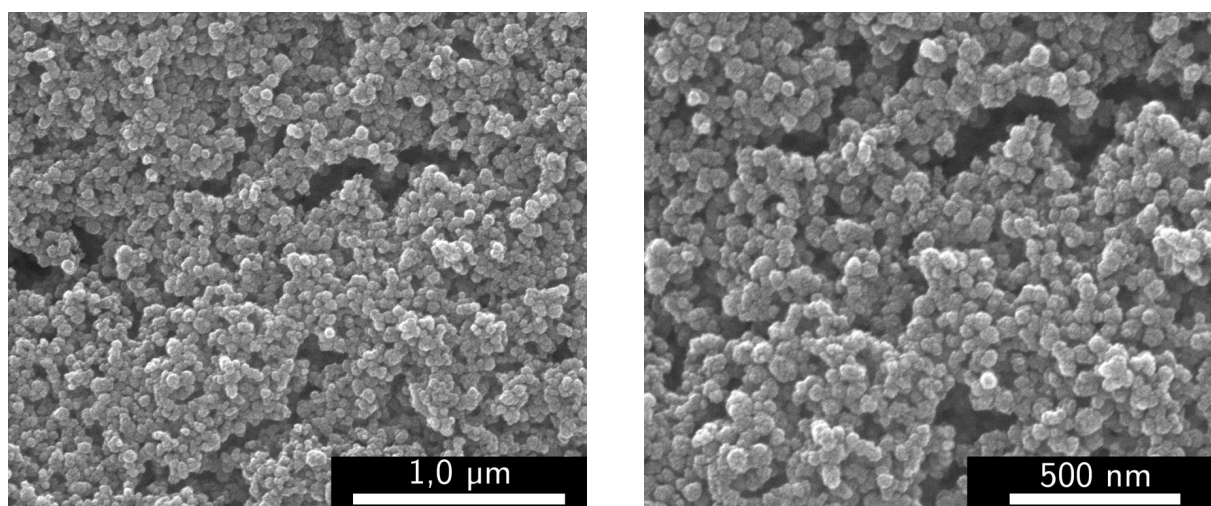


**Abb. 5.42:** Größenverteilungen (DLS) von CS-stabilisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln nach der Gefriertrocknung und Redispersion in Reinstwasser ( $N=3$ ).

Nach der Gefriertrocknung und der Redisperion in Reinstwasser wurde der monodisperse Charakter der Dispersion erhalten (Abbildung 5.42). Die Maxima der Größenverteilungen stiegen durch die Zentrifugationsschritte und die Gefriertrocknung von 85 auf 97 nm an. Der Betrag des Zetapotentials nahm durch die Zentrifugation und der Redisperion in Reinstwasser ab. Ein ähnliches Verhalten wurde bei CMC-stabilisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln beobachtet. Die Abnahme des Zetapotentials lässt sich mit dem geringeren Dissoziationsgrad der Sulfat- und Carboxylfunktionen in Reinstwasser im Vergleich zum Dissoziationsgrad unter Synthesebedingungen bei pH=9 erklären. Als schwache Säurefunktionen sind die Carboxylfunktionen bei pH=6,9 weniger stark dissoziiert als bei pH=9.

**Tab. 5.12:** Kolloidchemische Parameter (DLS) von CS-stabilisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln ( $N=3$ ).

	<i>z-average</i> / nm	Maximum / nm	PDI	$\zeta$ / mV
nach der Synthese	$184 \pm 11$	85	$0,198 \pm 0,038$	$-31 \pm 3$
redispergiert	$141 \pm 1$	89	$0,093 \pm 0,020$	$-23 \pm 3$
redispergiert und mit Trehalose steril filtriert	$142 \pm 3$	100	$0,058 \pm 0,014$	$-20 \pm 6$
gefriergetrocknet und redispergiert	$148 \pm 2$	97	$0,081 \pm 0,011$	$-24 \pm 1$



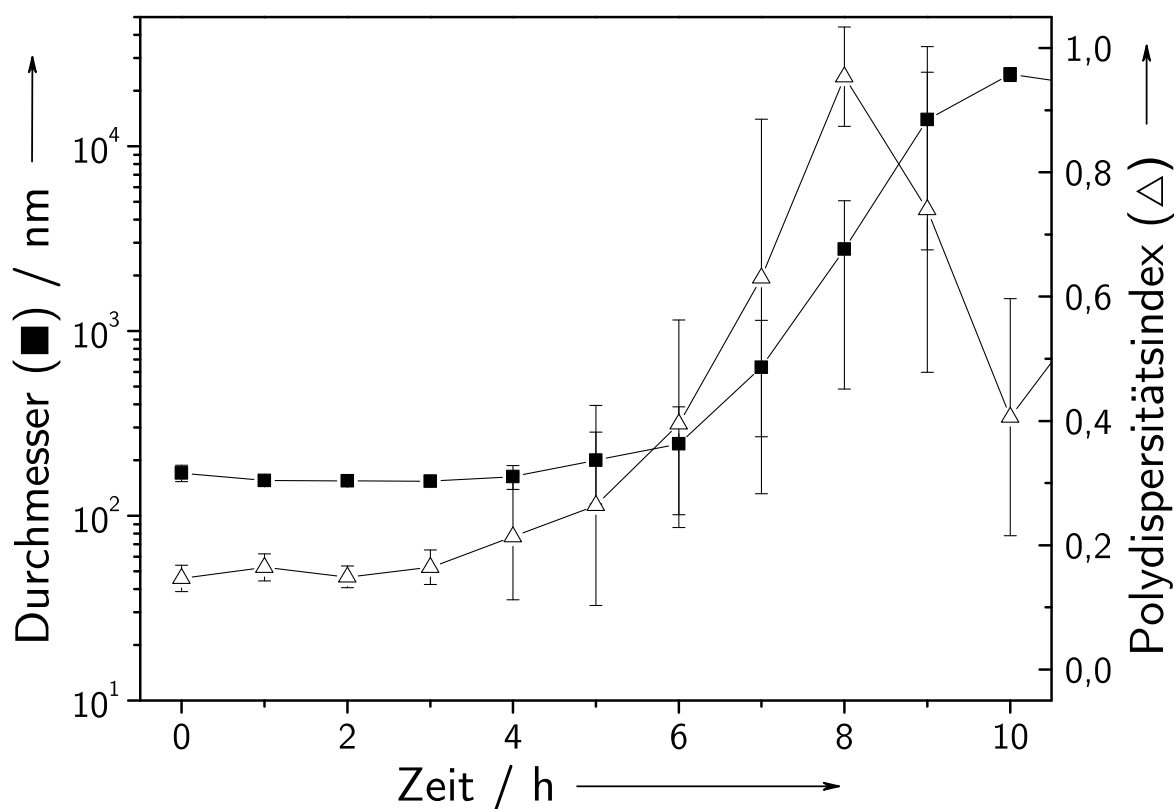
**Abb. 5.43:** Rasterelektronenmikroskopie von CS-stabilisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln nach zweifacher Zentrifugation, Redisperion in Reinstwasser und Trocknung an Luft.



Die kolloidchemischen Ergebnisse der Dynamischen Lichtstreuung sind in Tabelle 5.12 zusammengefasst.

Für rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen wurden überschüssiges Chondroitinsulfat und Gegenionen durch Zentrifugation und Redisperion in Reinstwasser entfernt und die Nanopartikel an Luft getrocknet. Die CS-stabilisierten Calciumphosphat-Nanopartikel zeigten kugelförmige Morphologien mit Kerndurchmessern von 50 bis 60 nm (Abbildung 5.43).

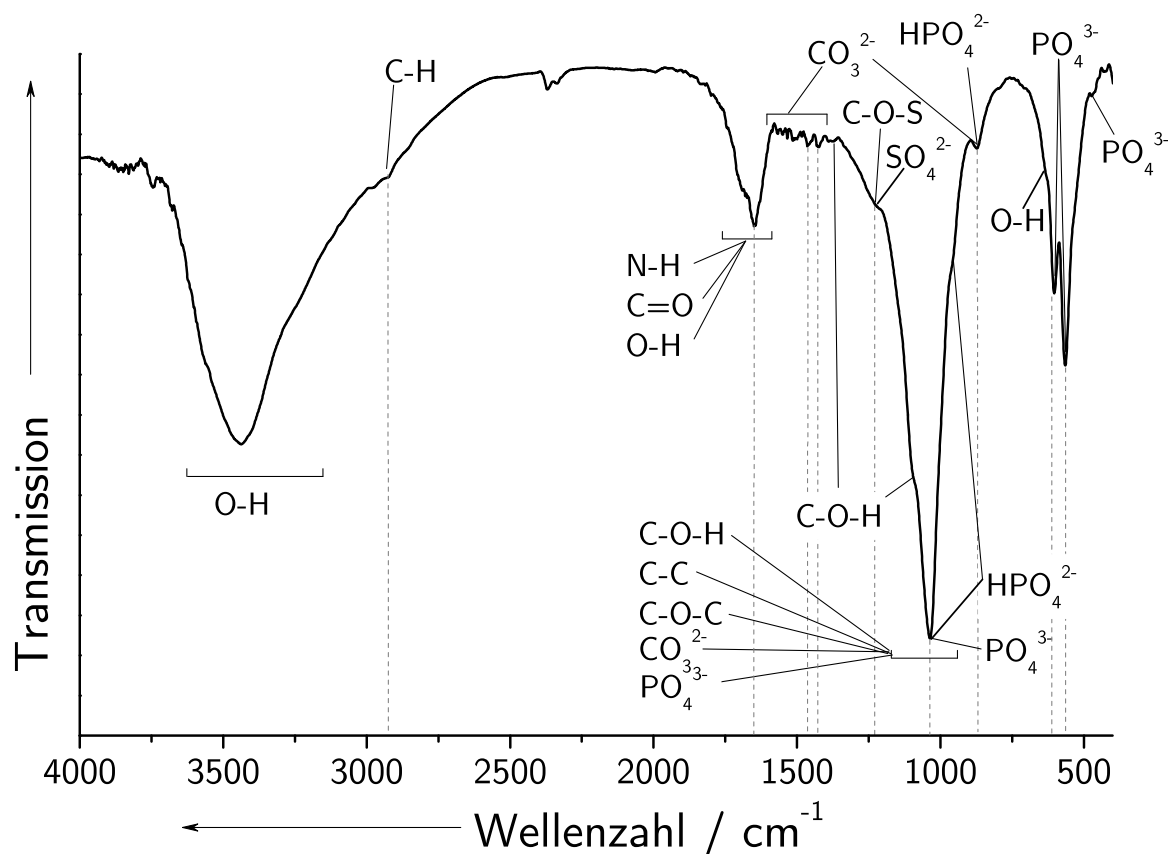
Die Stabilität der Nanopartikel wurde in RPMI-Medium mit 10 % FCS (V/V) bei 37 °C mit der Dynamischen Lichtstreuung über einen Zeitraum von 24 Stunden untersucht. Die mittleren hydrodynamischen Durchmesser (*z-average*) wurden dabei stündlich gemessen. In Abbildung 5.44 sind die mittleren hydrodynamischen Durchmesser und die zugehörigen Polydispersitätsindizes als Funktion der Zeit aufgetragen.



**Abb. 5.44:** Stabilität von CS-stabilisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln in RPMI-Medium mit 10 % FCS bei 37 °C ( $N=3$ ).

Der monodisperse Charakter der Dispersion nimmt nach 5 Stunden deutlich ab. Nach 8 Stunden sind die Nanopartikel aggregiert. Die hydrodynamischen Durchmesser (*z-average*)

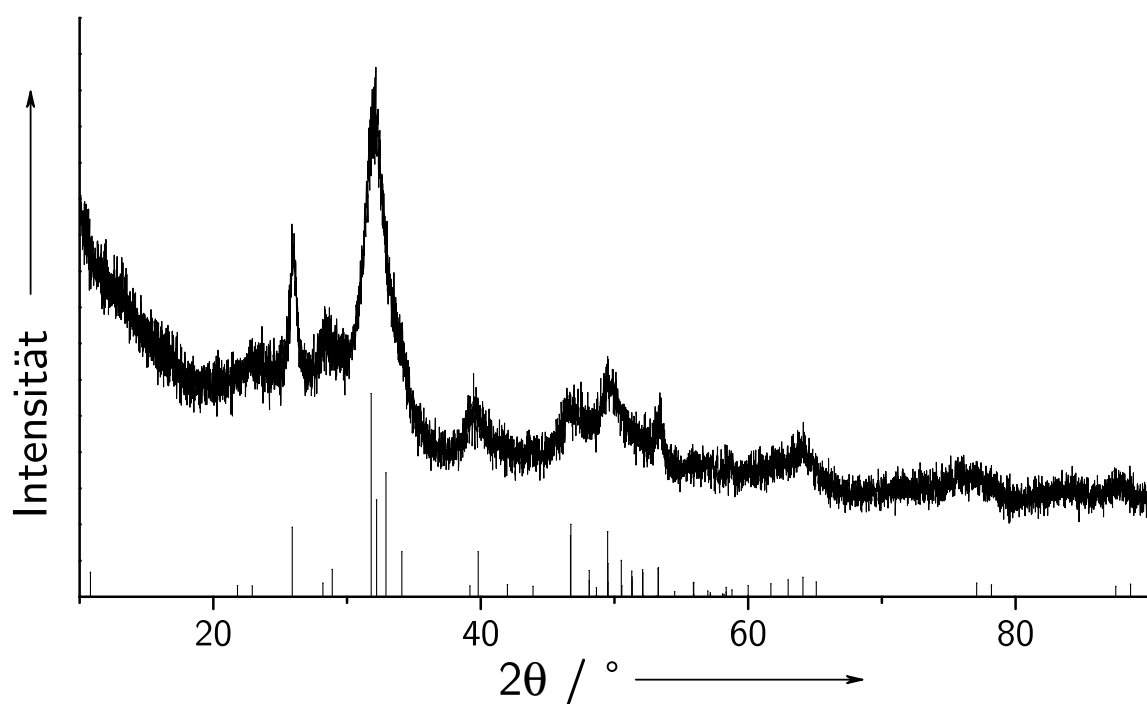
sind bei  $PDI > 0,3$  aufgrund der fehlenden Korrelation mit der Abklingfunktion zur Berechnung der hydrodynamischen Durchmesser nicht mehr aussagekräftig. CMC-stabilisierte Calciumphosphat-Nanopartikel behielten in RPMI mit 10 % FCS ihren monodispersen Charakter über einen Zeitraum von 24 Stunden. Dies könnte an den stärkeren elektrostatischen Wechselwirkung zwischen Sulfatgruppen und positiv geladenen Gruppen von Proteinen und sonstigen Serumbestandteilen liegen.



**Abb. 5.45:** Infrarotspektroskopie von CS-stabilisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln nach zweifacher Zentrifugation, Redispersion in Reinstwasser und Trocknung an Luft.

Das Infrarotspektrum von CS-stabilisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln zeigt sehr breite sich überlagernde Banden (Abbildung 5.45). Hier können wenige charakteristische Schwingungsbanden, wie die Phosphatschwingungen bei 472, 565 und 603  $\text{cm}^{-1}$  identifiziert werden.<sup>[487]</sup> Der Bereich von 950 bis 1200  $\text{cm}^{-1}$  zeigt breite, sich überlagernde Banden, die Phosphat- und Hydrogenphosphatschwingungen sowie Schwingungen des Pyranose-rings (C-C, C-O-H, C-O-C) zugeordnet werden können. Die Schulter bei 1100  $\text{cm}^{-1}$  und die sehr kleine Bande bei 1380  $\text{cm}^{-1}$  lassen sich den C-O-H-Valenz- und Deformationsschwingungen zuordnen.<sup>[488]</sup> Der Bereich von 1220 bis 1250  $\text{cm}^{-1}$  zeigt eine Schulter,

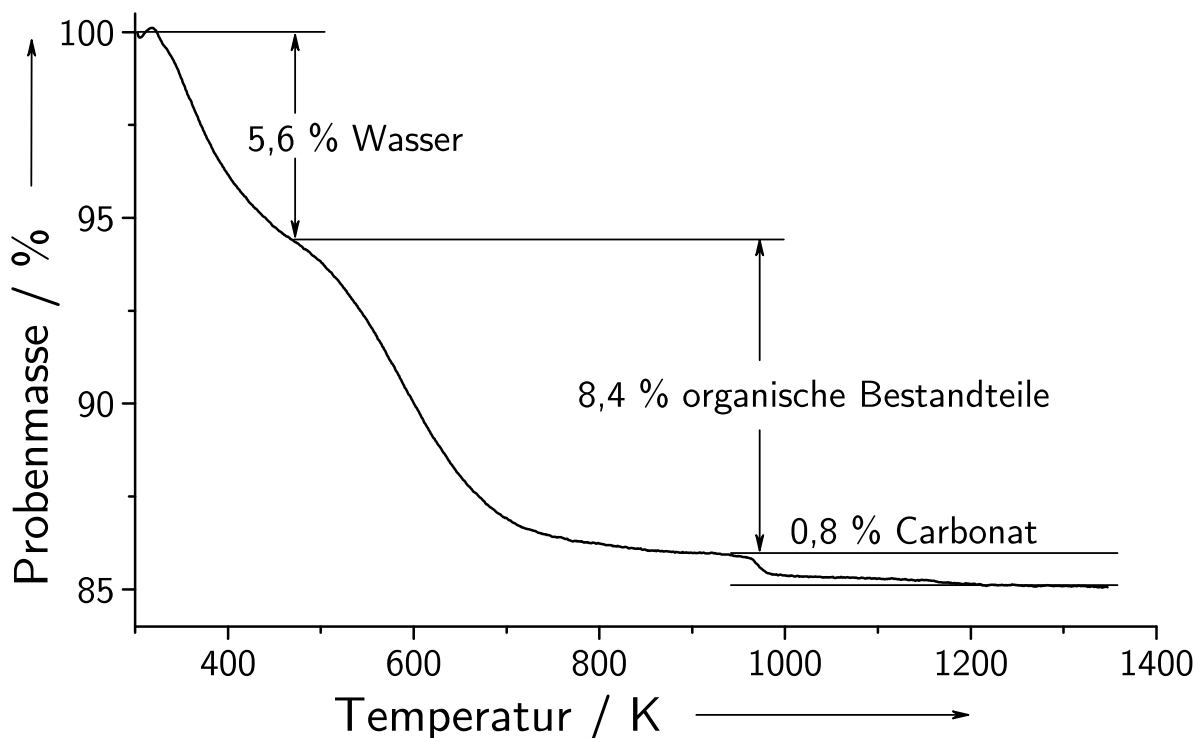
die bei CMC-stabilisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln nicht beobachtet wird. In diesem Bereich liegen die Valenzschwingungen der S=O und C–O–S Bindungen.<sup>[488–490]</sup> Die breite Bande im Bereich von 1600 bis 1750  $\text{cm}^{-1}$  kann durch die Überlagerung von Valenz- und Deformationsschwingungen der Carbonyl-, Hydroxyl- und Amidfunktionen stammen. Die eindeutige Zuordnung ist nicht möglich.<sup>[489–491]</sup> Die sehr breite Bande im Bereich von 2900 bis 3700  $\text{cm}^{-1}$  lässt sich OH-, CH- und C–O–H-Schwingungen zuordnen.<sup>[487,488,490]</sup> Das Pulverdiffraktogramm der CS-stabilisierten Calciumphosphat-Nanopartikel zeigt breite Beugungsreflexe von nanokristallinem Hydroxylapatit (Abbildung 5.46). Die Kristallitgrößen liegen im Bereich von 8 bis 11 nm. Dies deutet darauf hin, dass die Calciumphosphat-Nanopartikel aus mehreren Domänen bestehen, die miteinander verwachsen sind.



**Abb. 5.46:** Pulverdiffraktogramm von CS-stabilisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln nach zweifacher Zentrifugation, Redispersion in Reinstwasser und Trocknung an Luft.

Eine thermogravimetrische Untersuchung der getrockneten CS-stabilisierten Calciumphosphat-Nanopartikel ist in Abbildung 5.47 gezeigt. Nach der Trocknung wurden ein Wasseranteil von 5,6 %, ein organischer Anteil von 8,4 % und ein Carbonatanteil von 0,8 % festgestellt. Der Carbonatanteil lässt sich auf die nasschemische Fällung der Calciumphosphat-Nanopartikel in  $\text{CO}_2$ -haltigem Wasser zurückführen. Der Carbonatanteil lässt sich auch im Infrarotspektrum in den schwachen Valenz- und Deformationsschwingungen der

$\text{CO}_3^{2-}$ -Gruppe im Bereich von 1450 bis 1550  $\text{cm}^{-1}$  wiederfinden.<sup>[487]</sup>



**Abb. 5.47:** Thermogramm von CS-stabilisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln nach zweifacher Zentrifugation, Redispersion in Reinstwasser und Trocknung an Luft.

Elementaranalytische Untersuchungen wurden an den nach zweifacher Zentrifugation und Redispersion von überschüssigem Polyelektrolyten und Gegenionen befreiten Calciumphosphat-Nanopartikel nach Trocknung an Luft durchgeführt. Das Stoffmengenverhältnis von Calcium zu Phosphat lag bei 1,627 und damit unter dem stöchiometrischen Stoffmengenverhältnis des Hydroxylapatits von 1,667.

Mit dem elementaranalytisch ermittelte Gehalt an Kohlenstoff ( $3,63 \pm 0,08 \%$ ) ließ sich der Anteil an adsorbiertem Chondroitinsulfat an den Calciumphosphat-Nanopartikel abschätzen. Hierzu wurde der Gehalt an Kohlenstoff ( $w_C$ ) über die in Gleichung 5.18 angegebene Beziehung zur Berechnung des Anteils an Chondroitinsulfat ( $w_{CS}$ ) herangezogen. Zur Berechnung wurde die Molmasse der Monomereinheit unter Vernachlässigung der Molmasse eines Wassermoleküls (Anhydroform der Disaccharidmonomereinheit) verwendet.

$$w_{CS} = \frac{M_{\text{Monomer}}}{M_{C, \text{Monomer}}} \cdot w_C = \frac{435,353 \text{ g mol}^{-1}}{168,154 \text{ g mol}^{-1}} \cdot 3,69 \% = 9,6 \% \quad (5.18)$$

Nach Abzug des Carbonatanteils von 0,8 % ergibt sich ein Anteil an Chondroitinsulfat von 8,8 %. Dieser Anteil deckt sich mit dem thermogravimetrisch ermittelten Anteil flüchtiger organischer Bestandteile von 8,4 %. Die Trennung der flüchtigen Fraktionen im Heizprofil des Thermogramms kann für Wasser und organische Bestandteile aufgrund einer breiten Stufe nicht exakt bestimmt werden, so dass eine exakte Angabe der Massenanteile für Wasser und organischer Bestandteile nicht möglich ist. Die ermittelten Werte sind damit im Rahmen der Messungenauigkeit identisch. Die kolloidchemischen und festkörperchemischen Parameter der CS-stabilisierten Calciumphosphat-Nanopartikel sind in Tabelle 5.13 zusammengefasst.

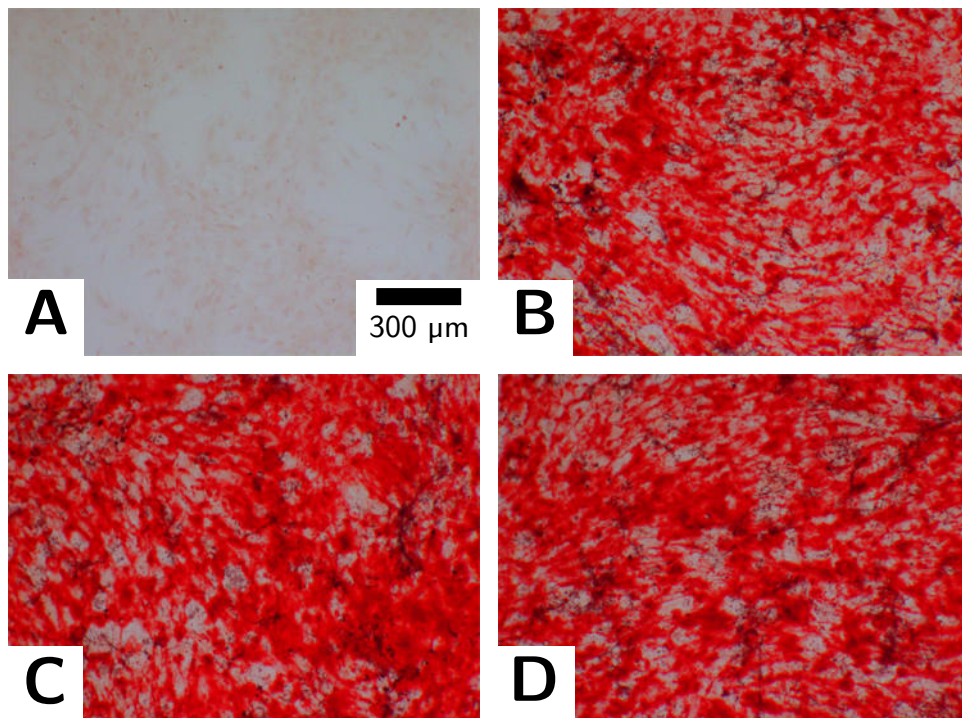
**Tab. 5.13:** Kolloidchemische Parameter der CS-stabilisierten Calciumphosphat-Nanopartikel.

Parameter	CS-stabilisierte Calciumphosphat-Nanopartikel
$d$ (REM) / nm	50 – 60
$d$ ( $z$ -average, DLS) / nm	$142 \pm 3$
$d$ (Maximum, DLS) / nm	100
PDI (DLS)	$0,058 \pm 0,014$
$\zeta$ (DLS) / mV	$-20 \pm 6$
Ca / %	$30,95 \pm 2,05$
$\text{PO}_4^{3-}$ / %	$49,62 \pm 2,28$
C / %	$3,63 \pm 0,08$
H / %	$1,52 \pm 0,13$
N / %	$1,45 \pm 0,12$
S / %	n.n.
Ca : P (n:n)	$1,483 \pm 0,203$
flüchtiger Anteil (TG) / %	14,8

Die sterilfiltrierten und gefriergetrockneten CS-stabilisierten Calciumphosphat-Nanopartikel wurden in zellbiologischen Experimenten hinsichtlich ihrer Wirkung auf die Differenzierung von humanen mesenchymalen Stammzellen untersucht. Zur Erhaltung des monodispersen Charakters der Dispersionen wurden die Calciumphosphat-Nanopartikel bis zu den biologischen Untersuchungen bei  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  gelagert.

## 5.8 Biologische Wirkung CS-stabilsierter Calciumphosphat-Nanopartikel auf die Differenzierung von hMSCs

Die biologische Wirkung von CS-stabilisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln gegenüber hMSCs wurde hinsichtlich der osteogenen, adipogenen und chondrogenen Differenzierung untersucht. Die Zellen wurden nach 24-stündiger Inkubation mit CMC- oder CS-stabilisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln in RPMI mit 10 % FCS (V/V) in osteogenen, adipogenen und chondrogenen Differenzierungsmedien inkubiert. In diesen Medien differenzieren die Zellen jeweils zu Osteoblasten, Adipozyten oder Chondrozyten unabhängig davon, ob sie mit Nanopartikeln inkubiert wurden oder nicht. Die biologische Wirkung der Calciumphosphat-Nanopartikel lässt sich an einer gesteigerten oder verminderten Differenzierung erkennen.

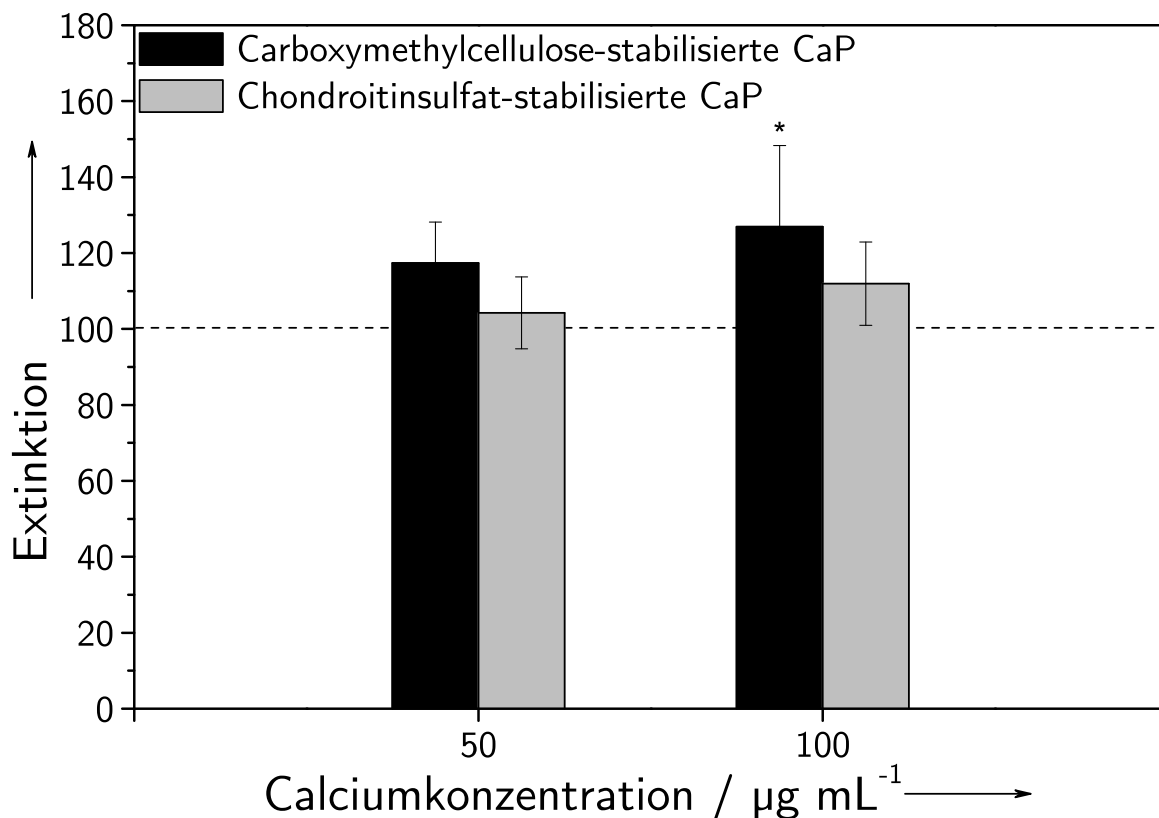


**Abb. 5.48:** Mikroskopische Aufnahmen von hMSCs nach der Anfärbung des intrazellulären Calciums mit *Alizarin Red S*. Die hMSCs wurden ohne Nanopartikel in RPMI mit 10 % FCS (V/V, **A**) und in osteogenem Differenzierungsmedium (**B**) inkubiert. Die hMSCs wurden ebenfalls mit CMC-stabilisierten (**C**) und mit CS-stabilisierten (**D**) Calciumphosphat-Nanopartikeln in osteogenem Differenzierungsmedium inkubiert.

Abbildung 5.48 zeigt die mit *Alizarin Red S* angefärbten hMSCs nach der Inkubation für 21 Tage in RPMI-Medium mit 10 % FCS (**A**) und in osteogenem Differenzierungsmedium (**B**)

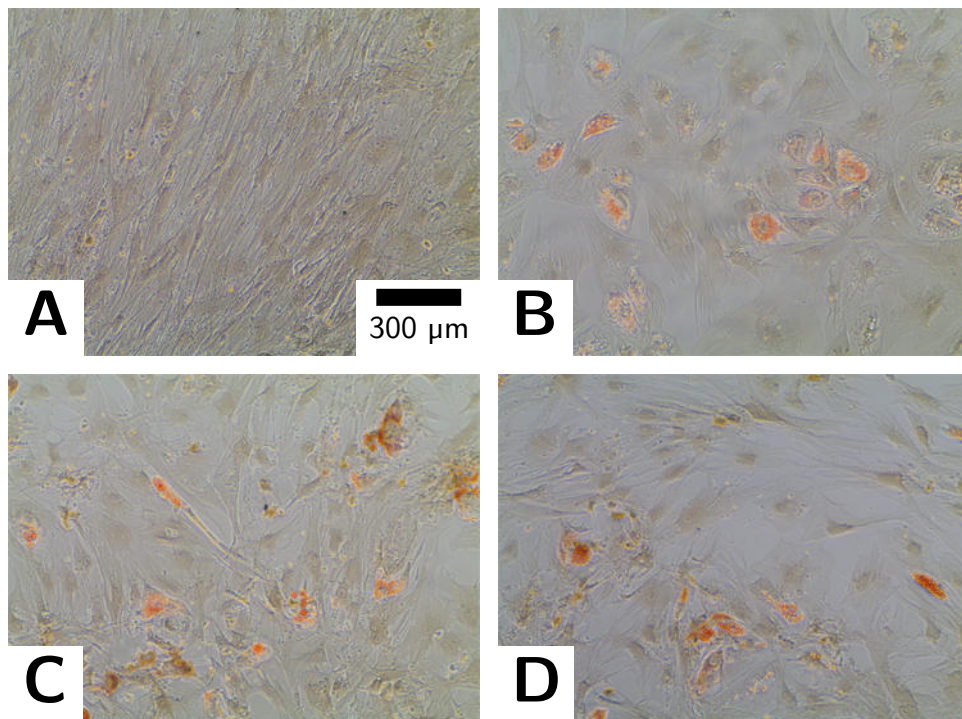
bis **D**). Die Zellen wurden zuvor 24 Stunden ohne Calciumphosphat-Nanopartikel (**A** und **B**), mit CMC-stabilisierten (**C**) und mit CS-stabilisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln (**D**) in RPMI mit 10 % FCS ( $V/V$ ) inkubiert. Die Partikelkonzentrationen wurden auf Calciumkonzentrationen von 50 und 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  normiert.

Durch Komplexierung von Calciumionen liefert *Alizarin Red S* durch seine rote Farbe Aufschluss über die Einlagerung von Calcium in sich differenzierenden hMSCs.<sup>[492,493]</sup> Alle Zellen, die in osteogenem Differenzierungsmedium inkubiert wurden, zeigten einen hohen Differenzierungsgrad (Abbildung 5.48). Die Negativkontrollen in RPMI-Medium mit 10 % ( $V/V$ ) FCS zeigten eine sehr geringe Färbung entsprechend des intrazellulären Calciumgehaltes in undifferenzierten Zellen. Die Inkubation der hMSCs mit CMC- und CS-stabilisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln in RPMI-Medium mit 10 % ( $V/V$ ) FCS löste keine osteogene Differenzierung aus. Mikroskopisch ließen sich die Differenzierungsgrade nicht beurteilen. Der Farbstoff wurde extrahiert und photometrisch quantifiziert.



**Abb. 5.49:** Quantitative Analyse der osteogenen Differenzierung von hMSCs nach der Inkubation mit CMC- und CS-stabilisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln. *Alizarin Red S* wurde extrahiert und photometrisch quantifiziert ( $N=3$ , \*  $p<0,05$ ).

In Abbildung 5.49 ist die Extinktion des Farbstoffs für die Inkubation mit CMC- und CS-stabilisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln gezeigt. Die gestrichelte Linie gibt die Extinktion der ohne Inkubation mit Calciumphosphat-Nanopartikeln gefärbten Zellen an. Bei Inkubation mit CMC- und CS-stabilisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln mit Partikelkonzentrationen entsprechend Calciumkonzentrationen von 50 und 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  liegen die gemessenen Extinktionen geringfügig oberhalb der Kontrolle. Die Mittelwerte der gemessenen Extinktionen unterscheiden sich bis auf 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  CMC-stabilisierte Calciumphosphat-Nanopartikel jedoch nicht signifikant von den Kontrollen. Die Inkubation mit CS-stabilisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln zeigte keinen Einfluss auf die osteogene Differenzierung von hMSCs.



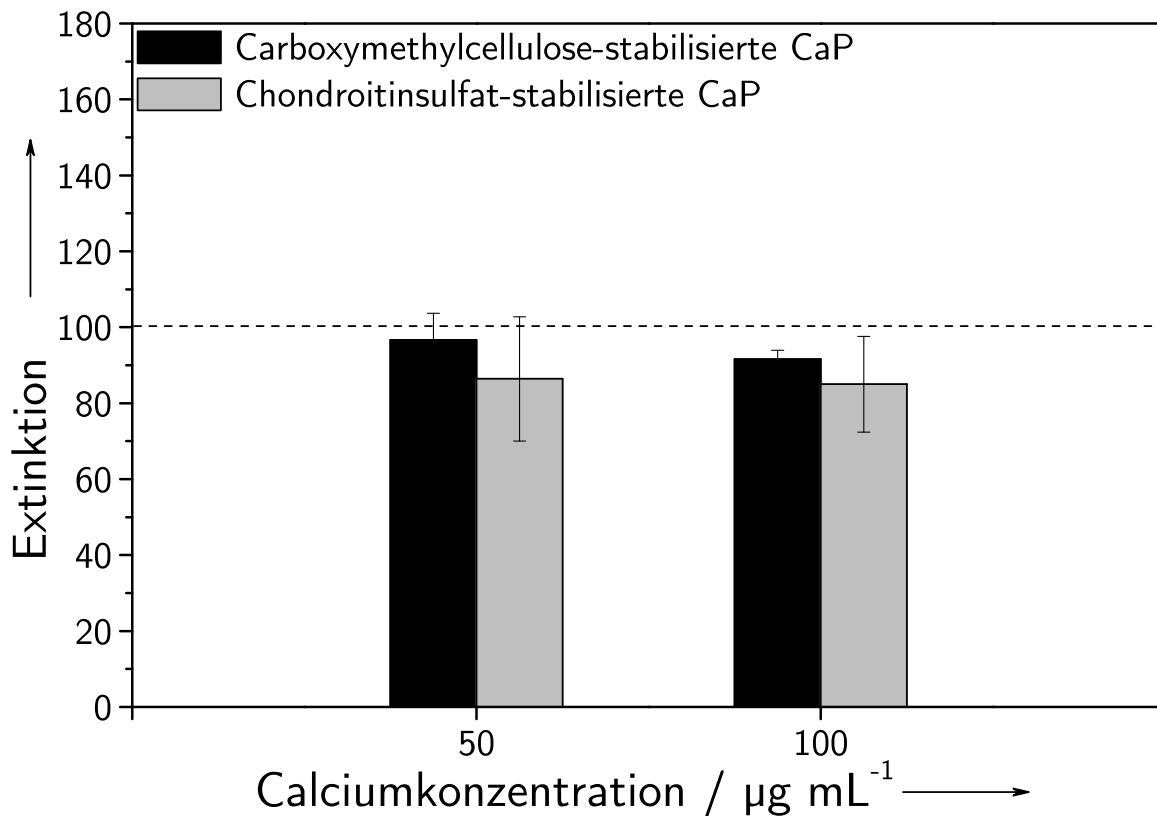
**Abb. 5.50:** Mikroskopische Aufnahmen von hMSCs nach der Anfärbung der intrazellulären Triglyceride mit *Oil Red O*. Die hMSCs wurden ohne Nanopartikel in RPMI mit 10 % FCS (V/V, **A**) und in adipogenem Differenzierungsmedium (**B**) inkubiert. Die hMSCs wurden ebenfalls mit CMC-stabilisierten (**C**) und mit CS-stabilisierten (**D**) Calciumphosphat-Nanopartikeln in adipogenem Differenzierungsmedium inkubiert.

Abbildung 5.50 zeigt die mit *Oil Red O* angefärbten hMSCs nach der Inkubation für 14 Tage in RPMI-Medium mit 10 % FCS (**A**) und in adipogenem Differenzierungsmedium (**B** bis **D**). Die Zellen wurden zuvor 24 Stunden ohne Calciumphosphat-Nanopartikel (**A** und **B**), mit CMC-stabilisierten (**C**) und mit CS-stabilisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln



(D) inkubiert. Die Partikelkonzentrationen wurden auf Calciumkonzentrationen von 50 und 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  normiert.

*Oil Red O* färbt als fettlöslicher Azofarbstoff Triglyceride in Zellen und ist ein Maß für die adipogene Differenzierung der Zellen.<sup>[494–498]</sup> Der Differenzierungsgrad lässt sich photometrisch quantifizieren. In allen Aufnahmen in Abbildung 5.50 lassen sich orange gefärbte Lipidtröpfchen in den Zellen erkennen. Der Farbstoff wurde extrahiert und photometrisch quantifiziert. Die Negativkontrollen in RPMI mit 10 % (V/V) FCS zeigten keine Färbung.

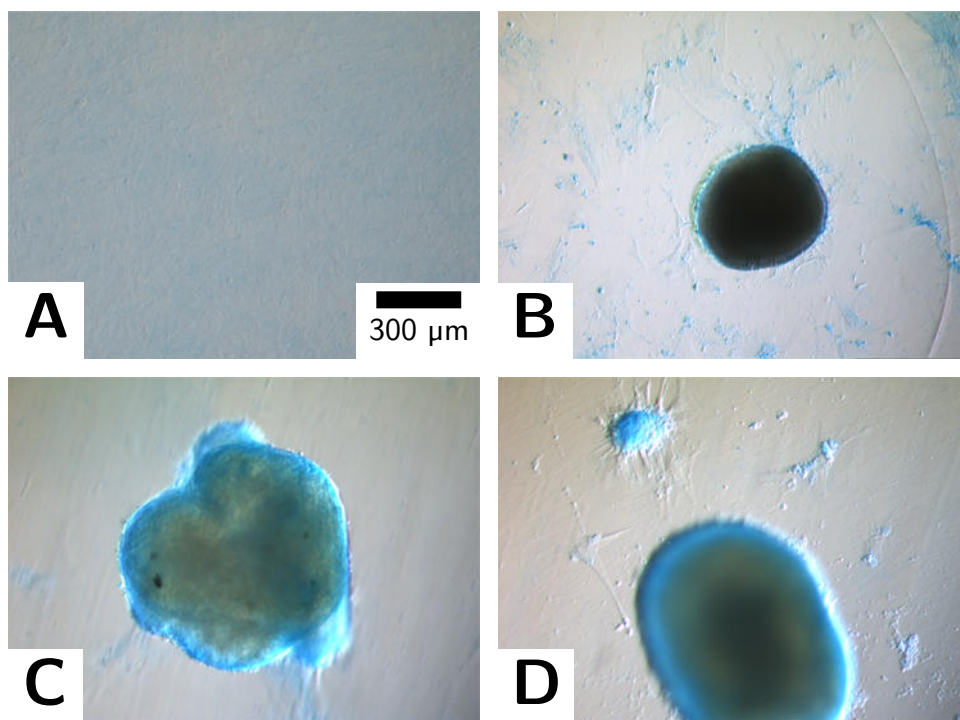


**Abb. 5.51:** Quantitative Analyse der adipogenen Differenzierung von hMSCs nach Inkubation mit CS- und CMC-stabilisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln. *Oil Red O* wurde extrahiert und photometrisch quantifiziert ( $N=3$ ).

In Abbildung 5.51 ist die Extinktion des Farbstoffs für die Inkubation mit CMC- und CS-stabilisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln gezeigt. Die gestrichelte Linie gibt die Extinktion der ohne Inkubation mit Calciumphosphat-Nanopartikeln gefärbten Zellen nach 14-tägiger Inkubation in adipogenem Differenzierungsmedium an. Bei Inkubation mit CMC- und CS-stabilisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln mit Partikelkonzentrationen entsprechend Calciumkonzentrationen von 50 und 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  liegen die gemessenen Extinktionen geringfügig unterhalb der Kontrolle. Die Mittelwerte der gemessenen Extinktio-

nen unterscheiden sich jedoch nicht signifikant von den Kontrollen. Weder die Inkubation mit CMC-, noch die Inkubation mit CS-stabilisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln, zeigte einen Einfluss auf die adipogene Differenzierung von hMSCs.

Die chondrogene Differenzierung von hMSCs wurde nach der Inkubation mit CMC- und CS-stabilisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln und anschließender Inkubation der pelletierten Zellen in chondrogenem Differenzierungsmedium untersucht. In Abbildung 5.52 sind mikroskopische Aufnahmen nach Anfärbung der pelletierten Zellen mit *Alcian Blue* gezeigt. *Alcian Blue* bildet mit Glycopolysacchariden blau gefärbte Komplexe.<sup>[499]</sup>



**Abb. 5.52:** Mikroskopische Aufnahmen von hMSCs nach der Anfärbung von Glycopolysacchariden mit *Alcian Blue*. Die hMSCs wurden ohne Nanopartikel in RPMI mit 10 % FCS (V/V, **A**) und in chondrogenem Differenzierungsmedium (**B**) inkubiert. Die hMSCs wurden ebenfalls mit CMC-stabilisierten (**C**) und mit CS-stabilisierten (**D**) Calciumphosphat-Nanopartikeln in chondrogenem Differenzierungsmedium inkubiert.

Die pelletierten hMSCs bildeten in den chondrogenen Differenzierungsmedien Zellaggregate aus. In RPMI mit 10 % FCS wurde die Aggregation der Zellen nicht beobachtet. Die Zellen differenzierten hier nicht zu Adipozyten. Die Inkubation mit CMC- und CS-stabilisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln führte nicht zur chondrogenen Differenzierung der Zellen. Die Quantifizierung des Farbstoffs der angefärbten Glycopolysaccharide der Zellaggregate in den chondrogenen Differenzierungsmedien konnte nicht durchgeführt

werden, da die Diffusion im pelletierten Zellverband stark gehemmt war. Die biologische Wirkung der CMC-stabilisierten und CS-stabilisierten Calciumphosphat-Nanopartikel ließ sich daher nicht quantitativ beurteilen.

In der Literatur wird der stimulierende Einfluss von Calciumphosphat-basierten Biomaterialien auf die Knochenneubildung beschrieben. Hybridmaterialien aus nanoskaligen Hydroxylapatit-Partikeln und Polymerkomponenten mit Zusatz von Wachstumsfaktoren zeigen eine stimulierende Wirkung auf die osteogene Differenzierung von hMSCs.<sup>[500–503]</sup> Schneiders *et al.* konnten zeigen, dass Chondroitin-4-sulfat einen osteokonduktiven Effekt auf hMSCs hervorrufen.<sup>[504]</sup>

Die in dieser Studie synthetisierten CMC- und CS-stabilisierten Calciumphosphat-Nanopartikel zeigten eine geringe Wirkung auf die osteogene, adipogene und chondrogene Differenzierung von hMSCs nach 24-stündiger Inkubation in RPMI mit 10 % FCS (V/V) und anschließender Inkubation in den entsprechenden Differenzierungsmedien. Die Inkubation mit CMC-stabilisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln entsprechend einer Calciumkonzentration von  $100\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$  zeigte eine signifikante Zunahme der osteogenen Differenzierung. Die CMC- und CS-stabilisierten Calciumphosphat-Nanopartikel zeigten keinen zusätzlichen Einfluss auf die adipogene und chondrogene Differenzierung von hMSCs bei der Inkubation in den entsprechenden Differenzierungsmedien. Dies kann an dem grundsätzlich hohen Differenzierungsgrad der Zellen in den Differenzierungsmedien liegen. Die nicht signifikanten Effekte der Calciumphosphat-Nanopartikel deuten auf eine Differenzierung der hMSCs allein durch die in den Differenzierungsmedien enthaltenen Differenzierungsagenzien hin.

Zukünftige Studien werden zeigen, ob Kombinationen aus CS- und CMC-stabilisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln mit Wachstumsfaktoren die osteogene und chondrogene Differenzierung von hMSCs steigern können.

## 5.9 Gold-Nanopartikel

### 5.9.1 Gold-Nanopartikel durch Reduktion von Tetrachlorogoldsäure mit Natriumborhydrid

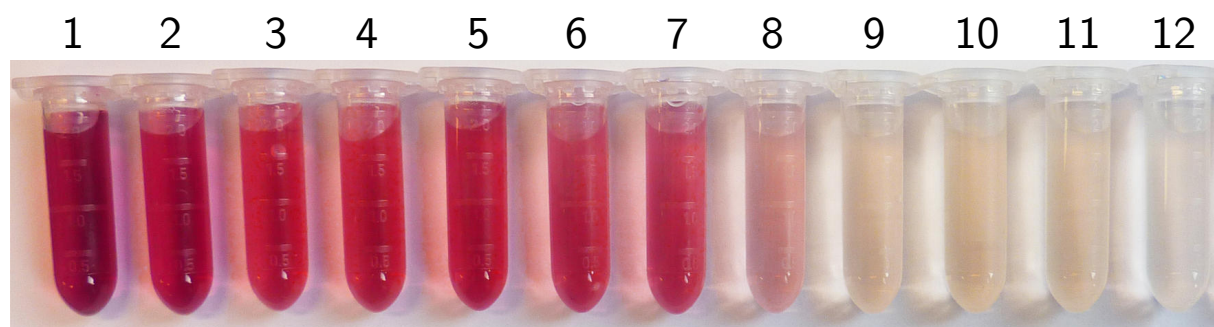
#### 5.9.1.1 Funktionalisierung mit Mercaptoethylamin

Gold-Nanopartikel wurden ausgehend von Tetrachlorogoldsäure durch Reduktion mit Natriumborhydrid in Gegenwart von Mercaptoethylamin (MEA) hergestellt. Die Reduktionen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Stoffmengenverhältnisse zwischen Gold, Mercaptoethylamin und Natriumborhydrid wurden entsprechend Tabelle 5.14 variiert. Die Volumina der Reaktionsgemische wurden konstant gehalten. Nach Zugabe von  $\text{NaBH}_4$  wurden die Ansätze über Nacht bei Raumtemperatur stehen gelassen.

**Tab. 5.14:** Versuchsparmeter der Reduktion von  $\text{HAuCl}_4$  mit  $\text{NaBH}_4$  in Gegenwart von Mercaptoethylamin. In jeder Spalte sind die Stoffmengenverhältnisse der verschiedenen Ansätze aufgetragen ( $n:n:n$ ).

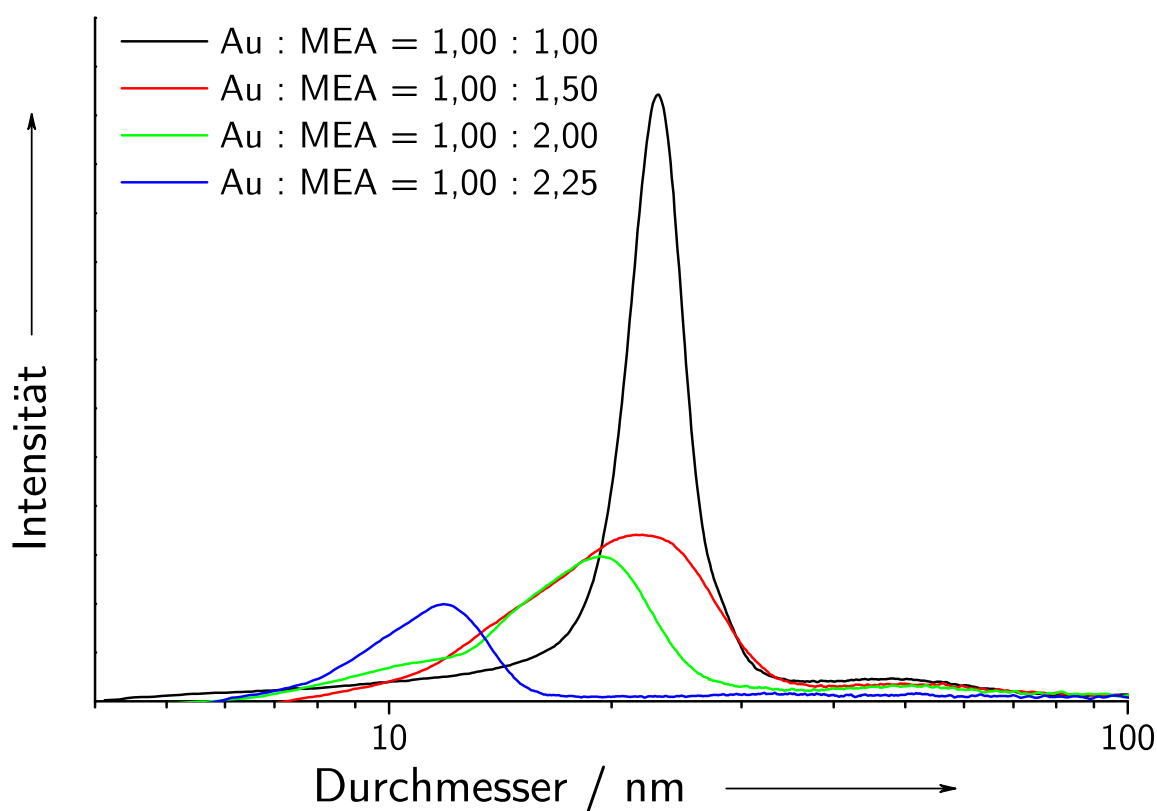
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Au	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
MEA	1,00	1,13	1,25	1,50	1,75	2,00	2,13	2,25	2,50	2,75	3,00	5,00
$\text{NaBH}_4$	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10

Die erhaltenen Dispersionen sind in Abbildungen 5.53 abgebildet. Mit abnehmendem Verhältnis von Gold zu Mercaptoethylamin nahmen die Färbungen der Dispersionen von tiefrot bis farblos ab.



**Abb. 5.53:** Gold-Nanopartikel-Dispersionen durch Reduktion von  $\text{HAuCl}_4$  mit  $\text{NaBH}_4$  in Gegenwart von Mercaptoethylamin. Von links nach rechts nimmt das Verhältnis von Gold zu MEA( $n:n$ ) entsprechend Tabelle 5.14 ab.

Die Dispersionen wurden mittels Scheibenzentrifugation untersucht. Die ermittelten Größenverteilungen nach der Intensität sind in Abbildung 5.54 aufgetragen. Die Reduktion mit einem Stoffmengenverhältnis von Gold zu MEA von 1,0:1,0 führte zu einem mittleren Durchmesser der Gold-Nanopartikel von 23 nm. Die Auftragungen der Durchmesser als Funktion der Partikelanzahl zeigten sehr breite Verteilungen ohne erkennbare Korrelation zum Verhältnis von Gold zu Mercaptoethylamin. Kim *et al.* beschrieben die Reduktion von  $\text{HAuCl}_4$  in Gegenwart von MEA mit  $\text{NaBH}_4$  mit einem Stoffmengenverhältnis von Gold zu Mercaptoethylamin von 2:3. Die erhaltenen kugelförmigen Gold-Nanopartikel zeigten mittlere Durchmesser von 29 nm.<sup>[505]</sup>



**Abb. 5.54:** Größenverteilungen (DCS) von Gold-Nanopartikeln durch Reduktion von  $\text{HAuCl}_4$  mit  $\text{NaBH}_4$  in Gegenwart von Mercaptoethylamin. Mit zunehmendem Gehalt an Mercaptoethylamin wurden kleinere mittlere Durchmesser erhalten.

Die Dispersionen ließen sich nach dem Zentrifugieren nicht in Reinstwasser redispergieren. In allen Ansätzen wurde ein harter Bodensatz oder ein Spiegel an der Gefäßwandung erhalten, welche sich auch durch Beschallung mit Ultraschall nicht wieder in Dispersion überführen ließen. Größere Mengen an Reduktionsmittel, mit  $\text{Au}:\text{NaBH}_4$ -Verhältnissen

von 0,5:1,0 und 1,0:1,0, führten zu polydispersen Dispersionen mit einem sehr starken Aggregationsverhalten, welche sich kolloidchemisch nicht charakterisieren ließen.

Anhand der Protolysestufen von Mercaptoethylamin (Abbildung 4.6, Abschnitt 4.4.4) in Wasser sollte in Reinstwasser die Aminofunktion protoniert vorliegen und zu einer elektrostatischen Abstoßung der Partikel untereinander führen. In allen untersuchten Dispersionen wurde allerdings eine starke Aggregationstendenz mit rascher Sedimentation beobachtet. Mercaptoethylamin adsorbiert in erster Linie über die Thiolfunktion an Goldoberflächen. Dabei zeigen protonierte Aminofunktionen in das umgebende Lösungsmittel.<sup>[324]</sup> Mercaptoethylamin kann jedoch auch in einer gewinkelten Konformation an der Oberfläche koordinieren. Dabei ist der Abstand zwischen Goldoberfläche und Aminofunktion kleiner als in gestreckter Konformation. Der Extremfall einer gewinkelten Konformation stellt eine Brücke dar, bei der sowohl die Thiol- als auch die Aminofunktion an die Goldoberfläche koordinieren. Obwohl Amine eine etwas geringere Affinität zu Goldoberflächen zeigen<sup>[325]</sup>, können die Gold-Nanopartikel über Mercaptoethylamin verbrücken und aggregieren.<sup>[324]</sup> Kurzkettige Thiolliganden zeigen die Tendenz, ungeordnetere Monolagen an Goldoberflächen auszubilden als langkettige Liganden.<sup>[323,324]</sup>

Aufgrund der geringen Stabilität der Mercaptoethylamin-funktionalisierten Gold-Nanopartikel wurden die Dispersionen nicht für Untersuchungen der Wechselwirkung mit Antikörpern herangezogen.

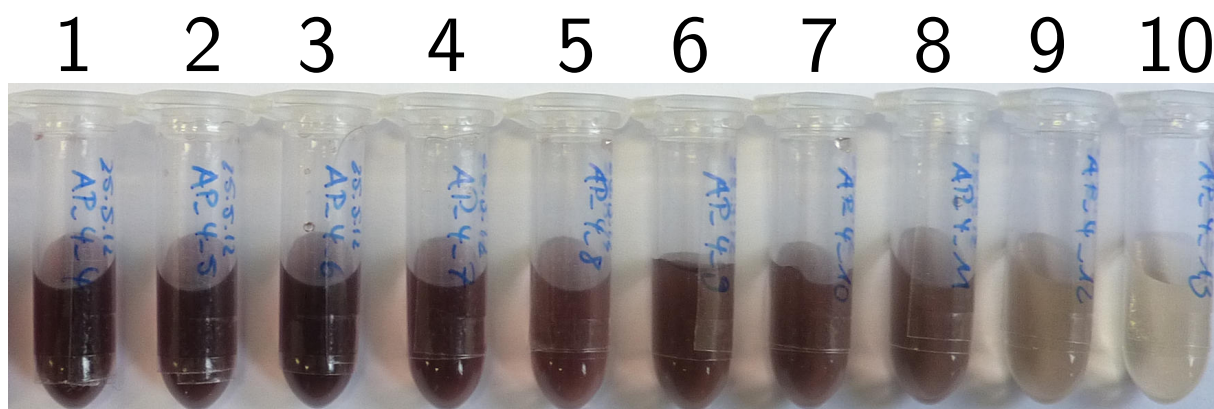
### 5.9.1.2 Funktionalisierung mit (*RS*)-Liponsäure

Gold-Nanopartikel wurden ausgehend von Tetrachlorogoldsäure durch Reduktion mit Natriumborhydrid in Gegenwart von (*RS*)-Liponsäure hergestellt. Die Reduktionen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Stoffmengenverhältnisse zwischen Gold, (*RS*)-Liponsäure und Natriumborhydrid wurden entsprechend Tabelle 5.15 variiert. Die Volumina der Reaktionsgemische wurden konstant gehalten.

**Tab. 5.15:** Versuchsparmeter der Reduktion von  $\text{HAuCl}_4$  mit  $\text{NaBH}_4$  in Gegenwart von (*RS*)-Liponsäure. In jeder Spalte sind die Stoffmengenverhältnisse der verschiedenen Ansätze aufgetragen ( $n:n:n$ ).

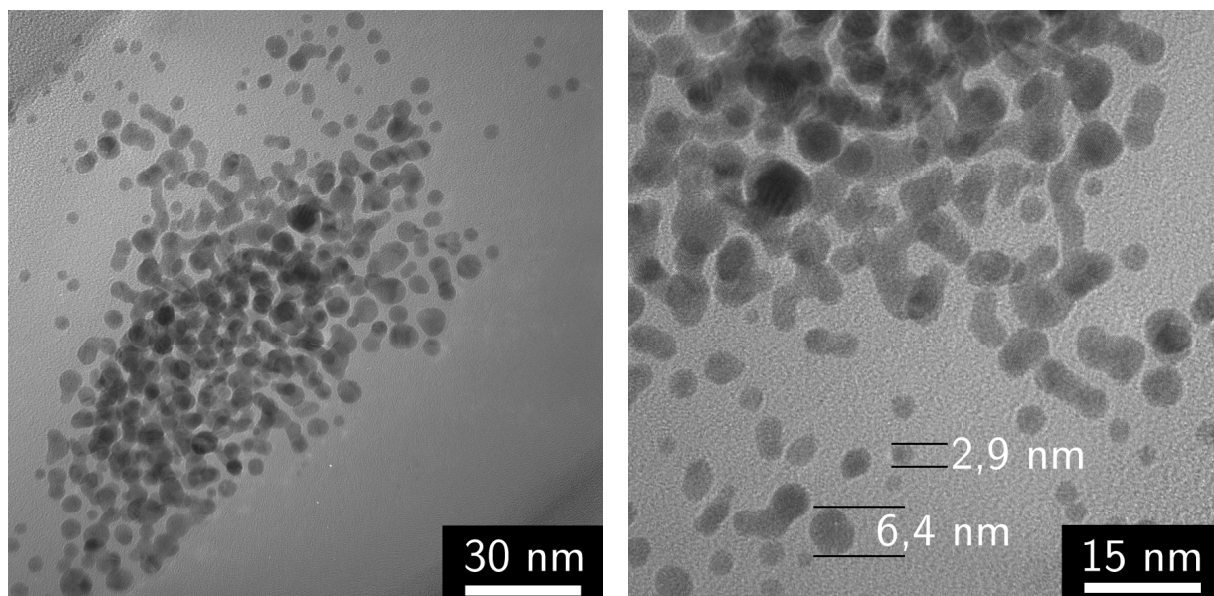
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Au	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
( <i>RS</i> )-Liponsäure	0,50	1,00	1,11	1,25	1,43	1,67	2,00	2,50	3,33	5,00
$\text{NaBH}_4$	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5





**Abb. 5.55:** Gold-Nanopartikel-Dispersionen nach der Reduktion von  $\text{HAuCl}_4$  mit  $\text{NaBH}_4$  in Gegenwart von (*RS*)-Liponsäure.

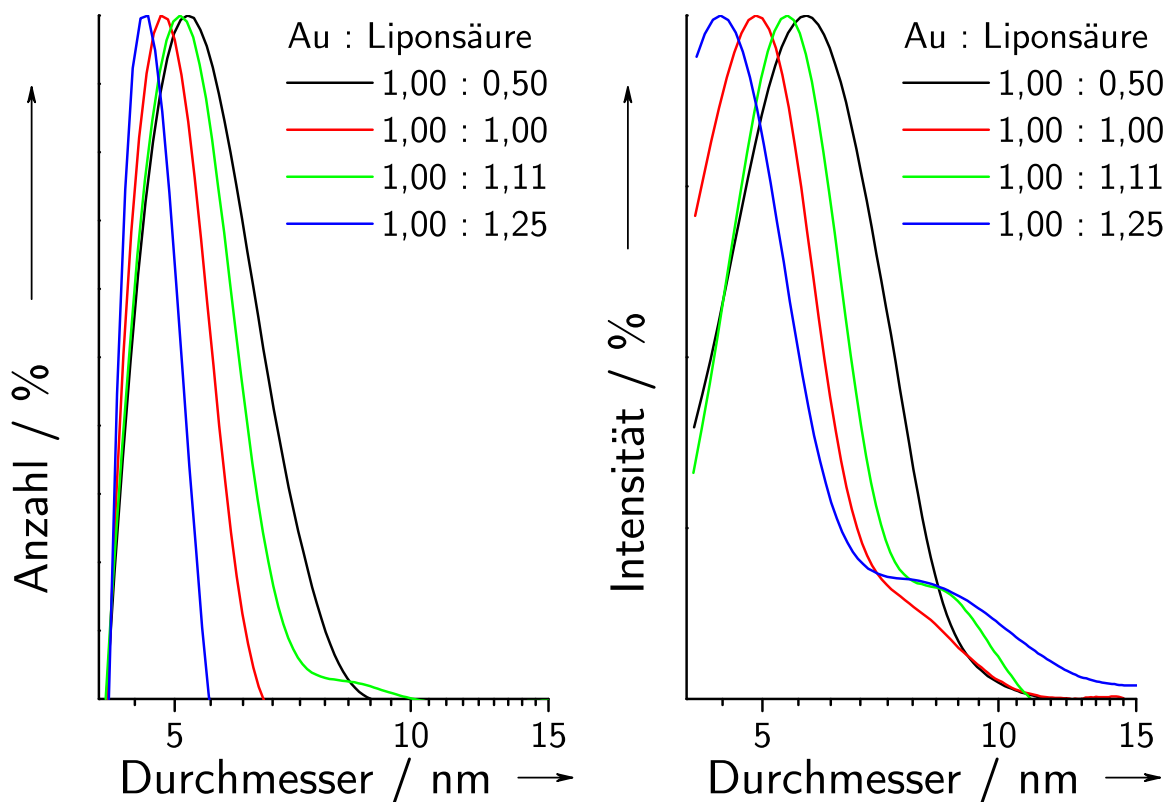
Bei Zugabe der Tetrachlorogoldsäure zur Vorlage der wässrigen Liponsäurelösung wurden rote Schlieren sichtbar, die sich unmittelbar wieder auflösten. Die erhaltenen Dispersionen nach Reduktion mit Natriumborhydrid sind in Abbildung 5.55 abgebildet. Mit abnehmendem Verhältnis von Au zu (*RS*)-Liponsäure, entsprechend Tabelle 5.15, nahm auch die Farbtintensität der Dispersionen von tiefrot bis gelblich ab. Die Dispersionen wurden bei 29.380 g für 20 Minuten zentrifugiert und im gleichen Volumen Reinstwasser redispergiert. Der kolloidale Charakter der Dispersionen wurde nach der Redispergierung in Reinstwasser wieder erhalten.



**Abb. 5.56:** Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen von Gold-Nanopartikeln nach der Reduktion von  $\text{HAuCl}_4$  mit  $\text{NaBH}_4$  in Gegenwart von (*RS*)-Liponsäure. Das Verhältnis von Gold zu (*RS*)-Liponsäure betrug 1,00:1,25.

Zwei exemplarische transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen von (*RS*)-Liponsäure-stabilisierten Gold-Nanopartikeln reduziert mit einem Stoffmengenverhältnis von Gold zu Liponsäure von 1,00:1,25 sind in Abbildung 5.56 gezeigt. Die Nanopartikel zeigten überwiegend kugelförmige Morphologien, wobei einige Partikel miteinander verwachsen waren. Die Durchmesser der Partikel variierten zwischen 1 und 8 nm.

In Abbildung 5.57 sind die Größenverteilungen der Scheibenzentrifugation nach der Anzahl (links) und nach der Intensität (rechts) aufgetragen. Die mittleren Durchmesser der Anzahlverteilung liegen bei 4,6 bis 5,2 nm. Die mittleren Durchmesser der Intensitätsverteilung sind mit 4,4 bis 5,6 nm nahezu identisch. Die breiteren Verteilungen der Auftragungen nach der Intensität deuten auf einen polydispersen Charakter der Dispersionen hin.

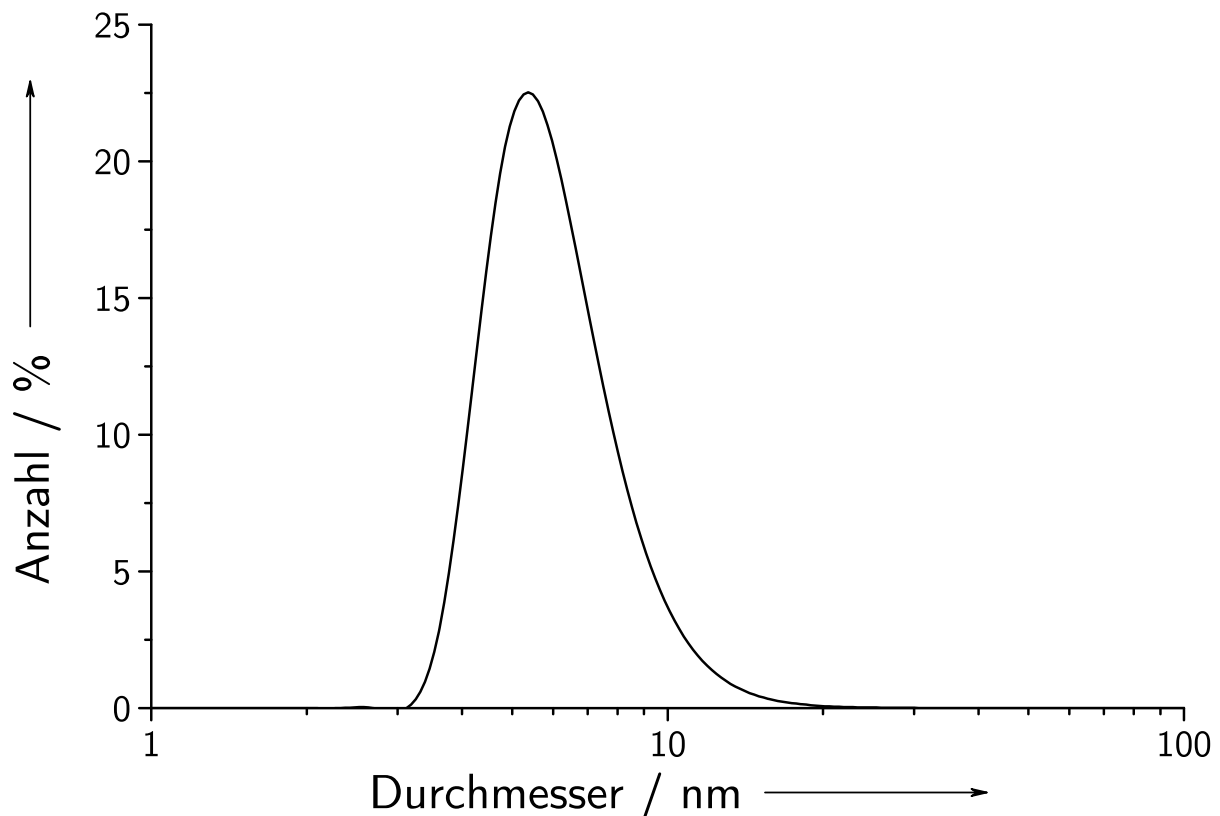


**Abb. 5.57:** Größenverteilungen (DCS) von Gold-Nanopartikeln nach der Reduktion von  $\text{HAuCl}_4$  mit  $\text{NaBH}_4$  in Gegenwart von (*RS*)-Liponsäure. Die breiteren Größenverteilungen in der Auftragung nach der Intensität deuten auf polydisperse Dispersionen hin.

Die Größenverteilungen der Dynamischen Lichtstreuung wiesen größere mittlere Durchmesser der zentrifugierten Gold-Nanopartikel auf. Die *z-average*-Werte lagen im Bereich



von 16 bis 237 nm und gaben nicht den kolloidalen Charakter der Dispersion wieder. Die Auftragungen nach der Anzahl zeigten monomodale Größenverteilungen mit Maxima bei 5 bis 6 nm. Eine exemplarische Größenverteilung mit einem Verhältnis von Gold zu (*RS*)-Liponsäure von 1,00:1,00 ist in Abbildung 5.58 gezeigt.

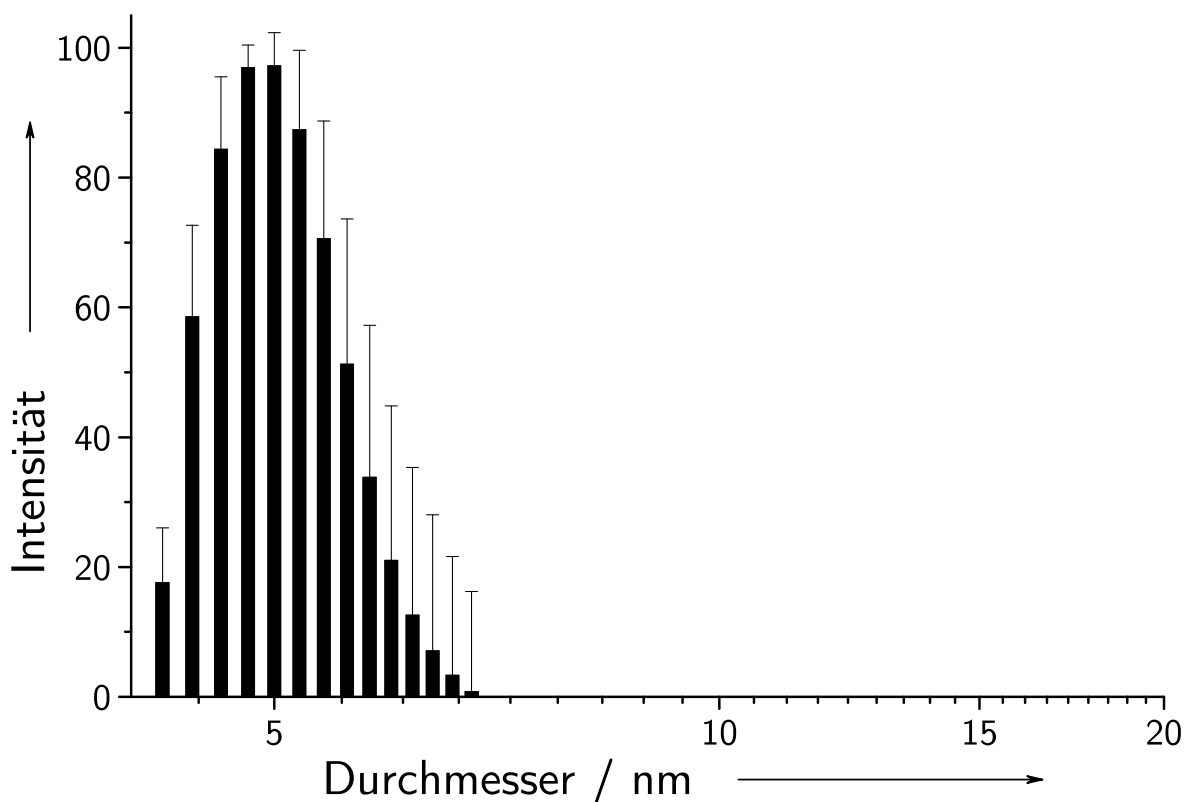


**Abb. 5.58:** Größenverteilungen (DLS) von Gold-Nanopartikeln nach der Reduktion von  $\text{HAuCl}_4$  mit  $\text{NaBH}_4$  in Gegenwart von (*RS*)-Liponsäure. Das Verhältnis von Gold zu (*RS*)-Liponsäure betrug 1,00:1,00.

Durch Erhöhung des Stoffmengenverhältnisses von Gold zu Natriumborhydrid von 1,00 : 0,50 auf 1,00 : 0,10 wurden größere mittlere Durchmesser erhalten. Aufgrund ihres polydispersen Charakters wurden die Dispersionen nicht für Untersuchungen der Wechselwirkungen mit Antikörpern herangezogen.

### 5.9.2 Gold-Nanopartikel durch Reduktion von Tetrachlorogoldsäure mit einem Gemisch aus Citrat und Gerbsäure

Gold-Nanopartikel wurden durch die Reduktion von Tetrachlorogoldsäure mit einem Gemisch aus Trinatriumcitrat und Gerbsäure hergestellt (Abschnitt 4.4.2). Die kolloidchemische Charakterisierung der Gold-Nanopartikel wurde mit der Scheibenzentrifugation durchgeführt. Die gemittelte Größenverteilung der Gold-Nanopartikel von drei unabhängigen Dispersionen ist in Abbildung 5.59 gezeigt.

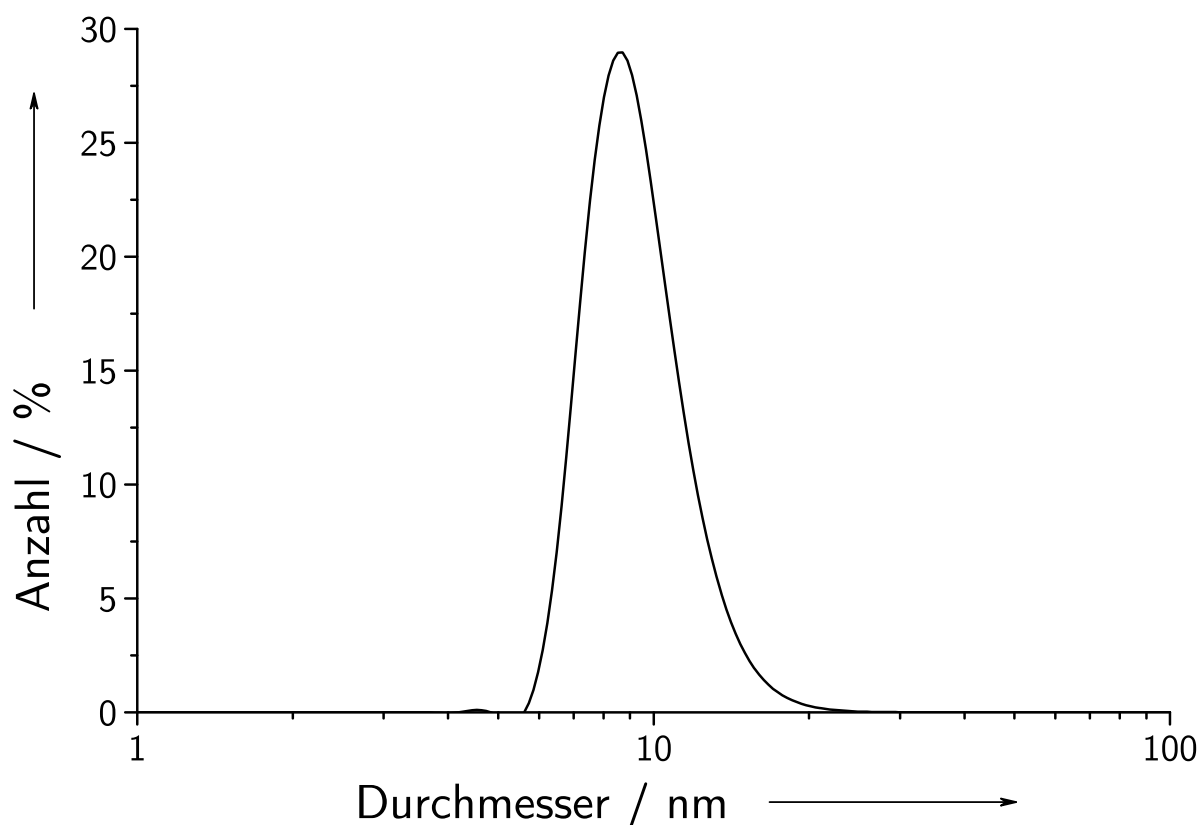


**Abb. 5.59:** Größenverteilung (DCS) von Gold-Nanopartikeln nach der Reduktion mit Citrat und Gerbsäure. Die Abbildung zeigt die gemittelte Größenverteilung aus drei unabhängigen Messungen. Der mittlere Durchmesser der Gold-Nanopartikel liegt bei 5 nm ( $N=3$ ).

Der mittlere Durchmesser der Nanopartikel liegt bei 5 nm. Die schmale Größenverteilung (4,2 bis 6,8 nm) deutet auf eine monodisperse Gold-Nanopartikel-Dispersion hin. Es wurden keine Partikel oder Aggregate mit Durchmessern größer 6,8 nm detektiert.

Die Größenverteilungen der Dynamischen Lichtstreuung wiesen größere mittlere Durchmesser der nicht zentrifugierten Gold-Nanopartikel auf. Die *z-average*-Werte lagen im Be-

reich von 100 bis 300 nm und gaben nicht den kolloidalen Charakter der Dispersion wieder. Die Polydispersitätsindizes lagen im Bereich von 0,6 bis 1. In der Auftragung nach der Anzahl der Partikel konnte ein Maximum bei  $d=9$  nm gemessen werden. Eine exemplarische Größenverteilung ist in Abbildung 5.60 aufgetragen. Das Zetapotential der Gold-Nanopartikel lag bei  $-57$  mV und deutet auf eine starke negative Oberflächenladung durch die stabilisierenden Citrat- und Gerbsäuremoleküle hin.

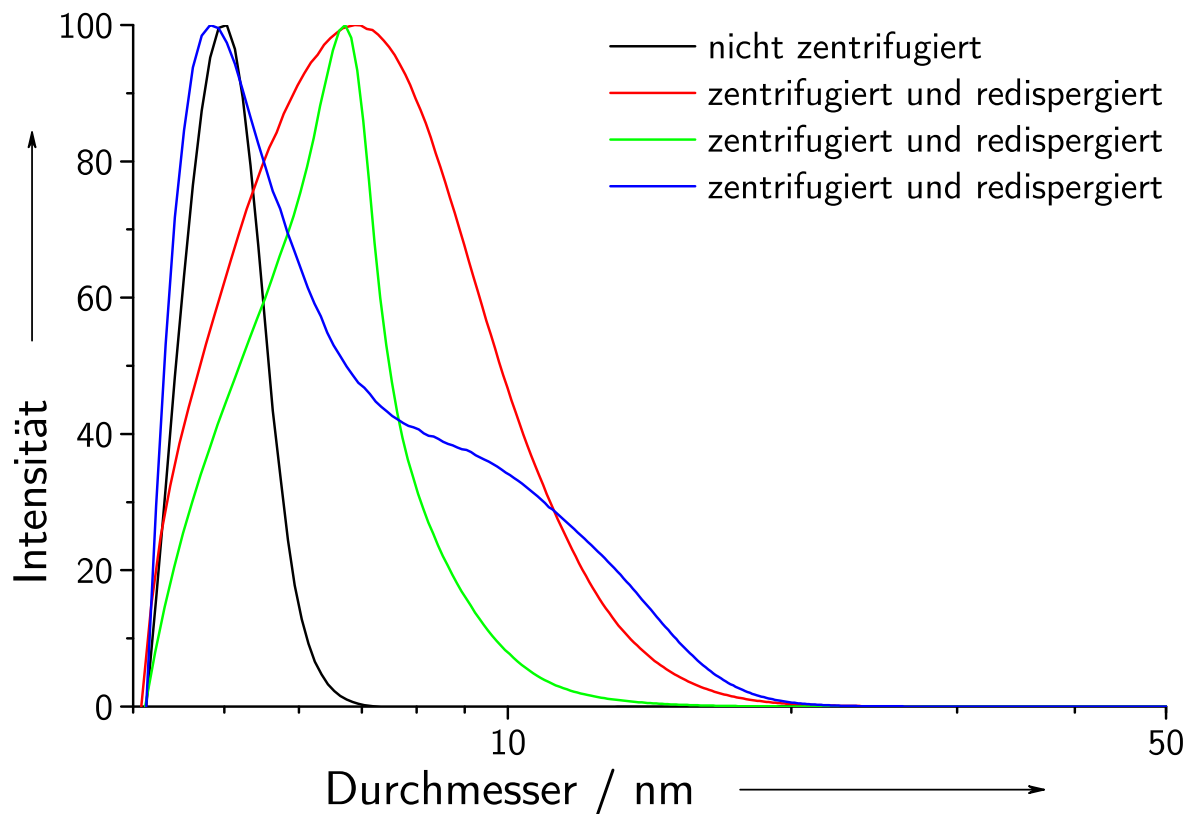


**Abb. 5.60:** Größenverteilung (DLS) von Gold-Nanopartikeln nach der Reduktion von  $\text{HAuCl}_4$  mit Citrat und Gerbsäure.

Die Gold-Nanopartikel konnten nicht zentrifugiert und in Reinstwasser redispergiert werden. Der kolloidale Charakter der ursprünglichen Dispersionen ging aufgrund irreversibler Aggregation der Nanopartikel bei der Zentrifugation verloren. Die Redispergierung der Nanopartikel in Reinstwasser war nicht möglich.

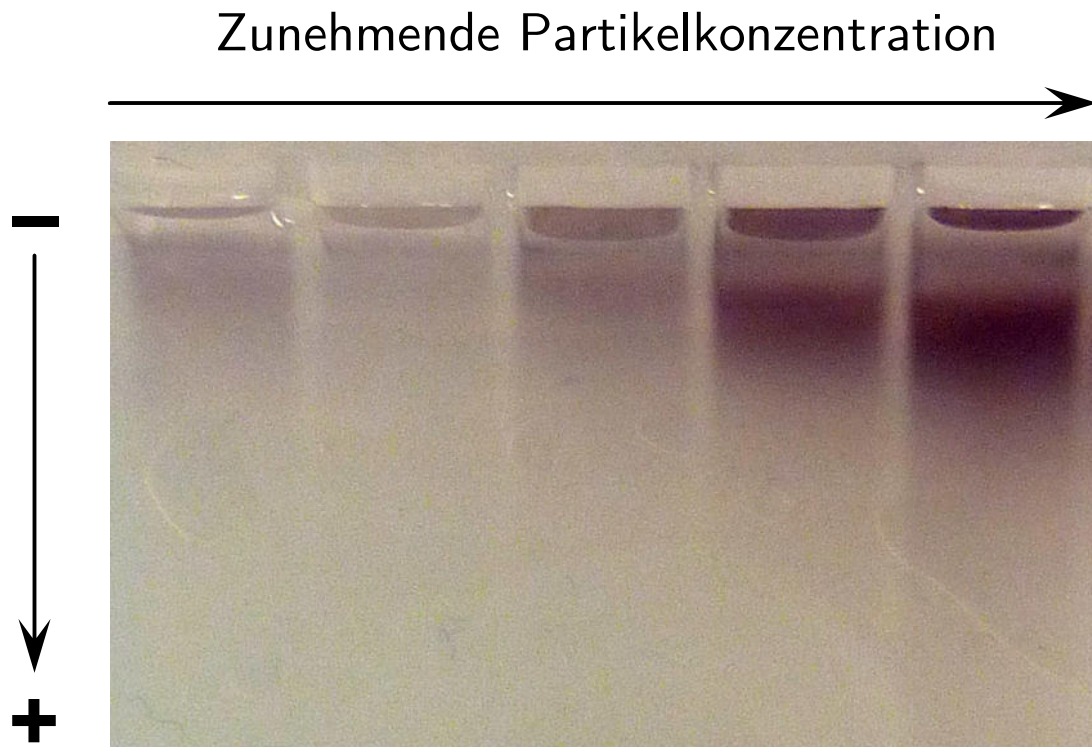
Abbildung 5.61 zeigt exemplarisch eine Größenverteilung der Gold-Nanopartikel nach der Synthese und drei Größenverteilungen der bei 66.000 g zentrifugierten und in Reinstwasser redispergierten Gold-Nanopartikel. Die Maxima der Größenverteilungen variierten nach der Zentrifugation stark und deuteten auf eine partielle Aggregation der Nanopartikel

hin. Bei geringeren relativen Zentrifugalbeschleunigungen kleiner 66.000 g konnten die Nanopartikel nicht abgetrennt werden.



**Abb. 5.61:** Größenverteilung (DCS) von Gold-Nanopartikeln nach der Reduktion von  $\text{HAuCl}_4$  mit Citrat und Gerbsäure, Zentrifugation und Redispergierung in Reinstwasser. Nach der Zentrifugation und Redispergierung in Reinstwasser variieren die Maxima und die Breiten der Größenverteilungen (blaue, grüne und rote Linie). Die schwarze Kurve zeigt die Größenverteilung der nicht zentrifugierten Gold-Nanopartikel nach der Synthese.

Die geringe Stabilität der mit Citrat und Gerbsäure stabilisierten Gold-Nanopartikel nach der Zentrifugation und Redispergierung in Reinstwasser ließ sich auch durch Untersuchungen ihrer elektrophoretischen Mobilität in einem Agarose-Gel zeigen. Dazu wurden Verdünnungen der Dispersion nach der Zentrifugation und Redispergierung in Reinstwasser bei einer Spannung von 74 V für 45 Minuten in einem 1 %-igen Agarose-Gel in TAE-Puffer bei  $\text{pH}=8,5$  untersucht. Das Agarosegel ist in Abbildung 5.62 abgebildet. Es lassen sich breite verschmierte Banden erkennen, die nur geringfügig durch die Gelmatrix gewandert sind. Die violette Farbe und die kurze Migrationsstrecke deuten auf aggregierte Gold-Nanopartikel hin.

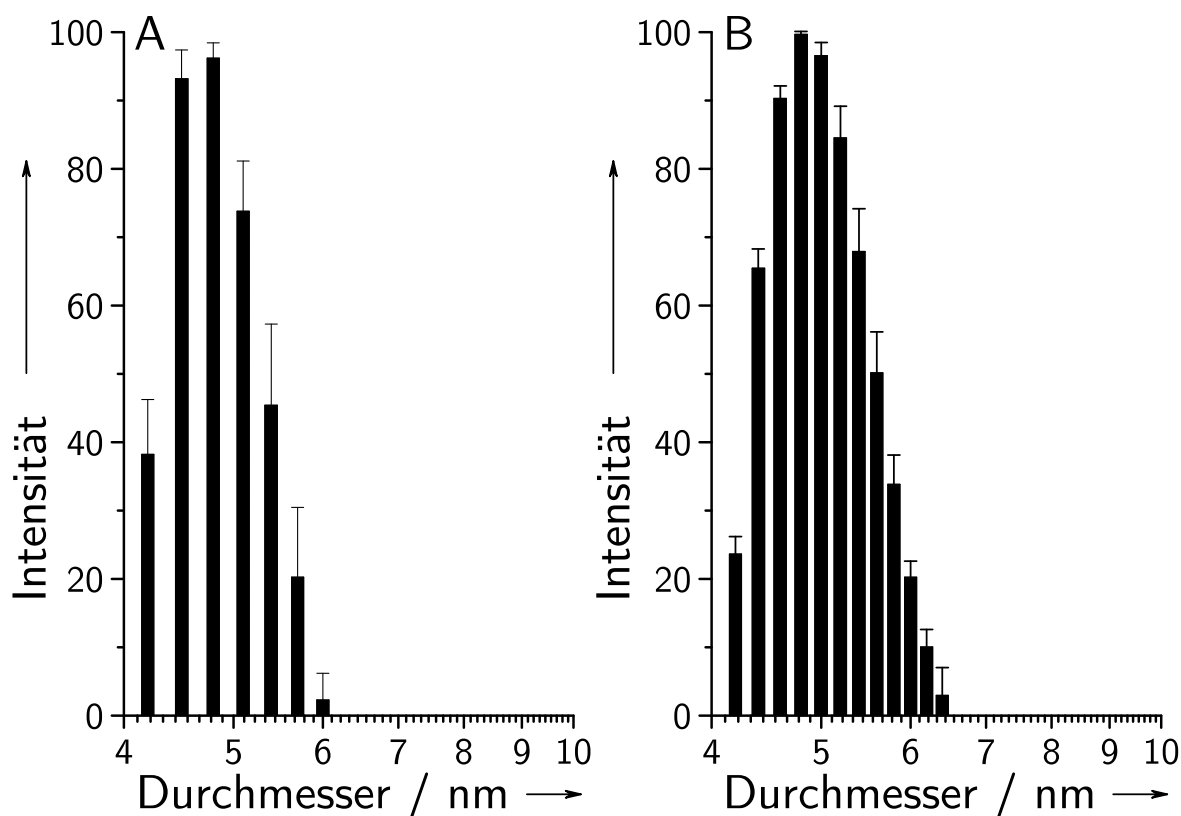


**Abb. 5.62:** Agarose-Gelelektrophorese von Gold-Nanopartikeln nach der Reduktion von  $\text{HAuCl}_4$  mit Citrat und Gerbsäure. Die Laufrichtung ist durch einen Pfeil angezeigt.

Die unzureichende Abtrennung der mit Citrat und Gerbsäure reduzierten und stabilisierten Gold-Nanopartikel von überschüssigem Citrat, Gerbsäure und nicht reduzierten Goldionen erforderte eine nachträgliche Stabilisierung der Nanopartikel. Ohne eine weitere Stabilisierung konnten die Gold-Nanopartikel aufgrund der Aggregation bei der Zentrifugation nicht redispergiert werden. Zur Stabilisierung der Gold-Nanopartikel wurden das Polymer Polyvinylpyrrolidon (Abschnitt 5.9.2.1) sowie die Thiol-Liganden Mercaptoethylamin (Abschnitt 5.9.2.2) und (*RS*)-Liponsäure (Abschnitt 5.9.2.3) gewählt.

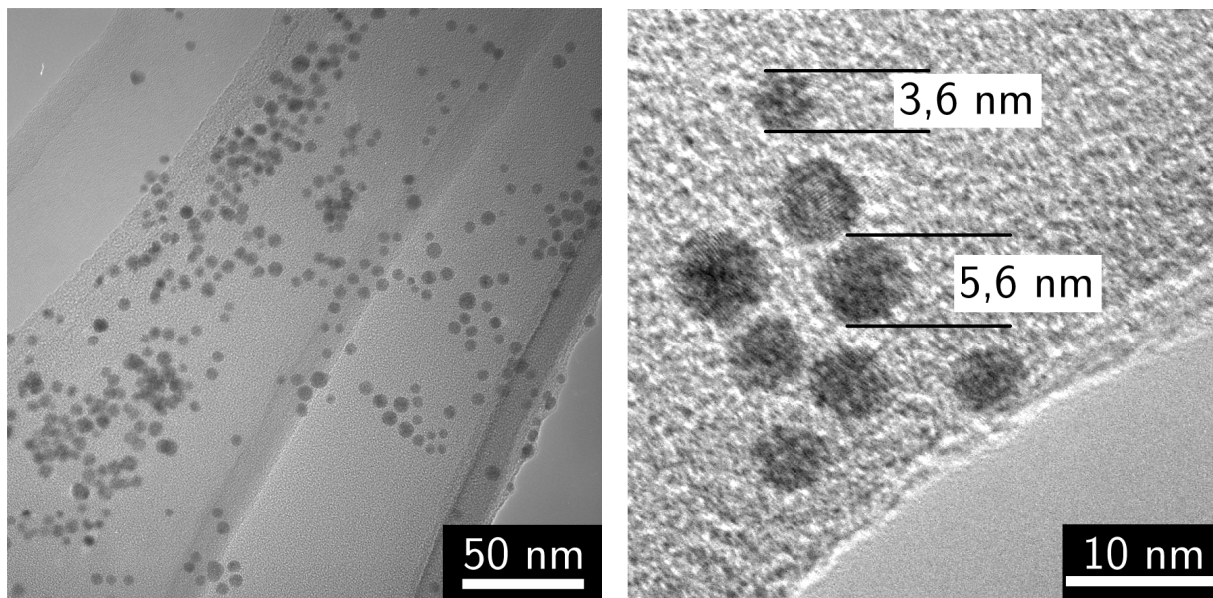
### 5.9.2.1 Stabilisierung mit Polyvinylpyrrolidon

Durch ein Gemisch aus 50 mg Trinatriumcitrat-Dihydrat und 12,5 mg Gerbsäure reduzierte und stabilisierte Gold-Nanopartikel ( $2,54 \cdot 10^{-5}$  mol Gold, Abschnitt 4.4.2) wurden nach der Synthese und langsamem Abkühlen auf Raumtemperatur mit 10 mg ( $3 \cdot 10^{-7}$  mol bezogen auf die mittlere Molmasse) des ungeladenen Polymers Polyvinylpyrrolidon versetzt und für 14 Stunden gerührt (Abschnitt 4.4.3). Die Gold-Nanopartikel wurden bei 66.000 g zweifach zentrifugiert und jeweils in Reinstwasser redispergiert, um überschüssiges Polymer aus der Dispersion zu entfernen. Die Größenverteilungen der Gold-Nanopartikel wurden mit der Scheibenzentrifugation vor (A) und nach (B) zweifacher Zentrifugation bei 66.000 g und Redisperktion in Reinstwasser bestimmt (Abbildung 5.63). Die Größenverteilungen zeigen vor und nach der Zentrifugation eine enge Breite und ein Maximum bei  $d=5$  nm.



**Abb. 5.63:** Größenverteilungen (DCS) von Gold-Nanopartikeln nach der Reduktion von  $\text{HAuCl}_4$  mit Citrat und Gerbsäure und Stabilisierung mit PVP. Es sind die Größenverteilungen vor (A) und nach (B) zweifacher Zentrifugation bei 66.000 g und Redisperktion in Reinstwasser aufgetragen. Die Abbildung zeigt die gemittelten Größenverteilungen aus jeweils drei unabhängigen Messungen ( $N=3$ ).

Die Gold-Nanopartikel wurden transmissionselektronenmikroskopisch untersucht (Abbildung 5.64). Die Aufnahmen zeigen monodisperse Gold-Nanopartikel mit Kerndurchmessern von 3,6 bis 5,6 nm.

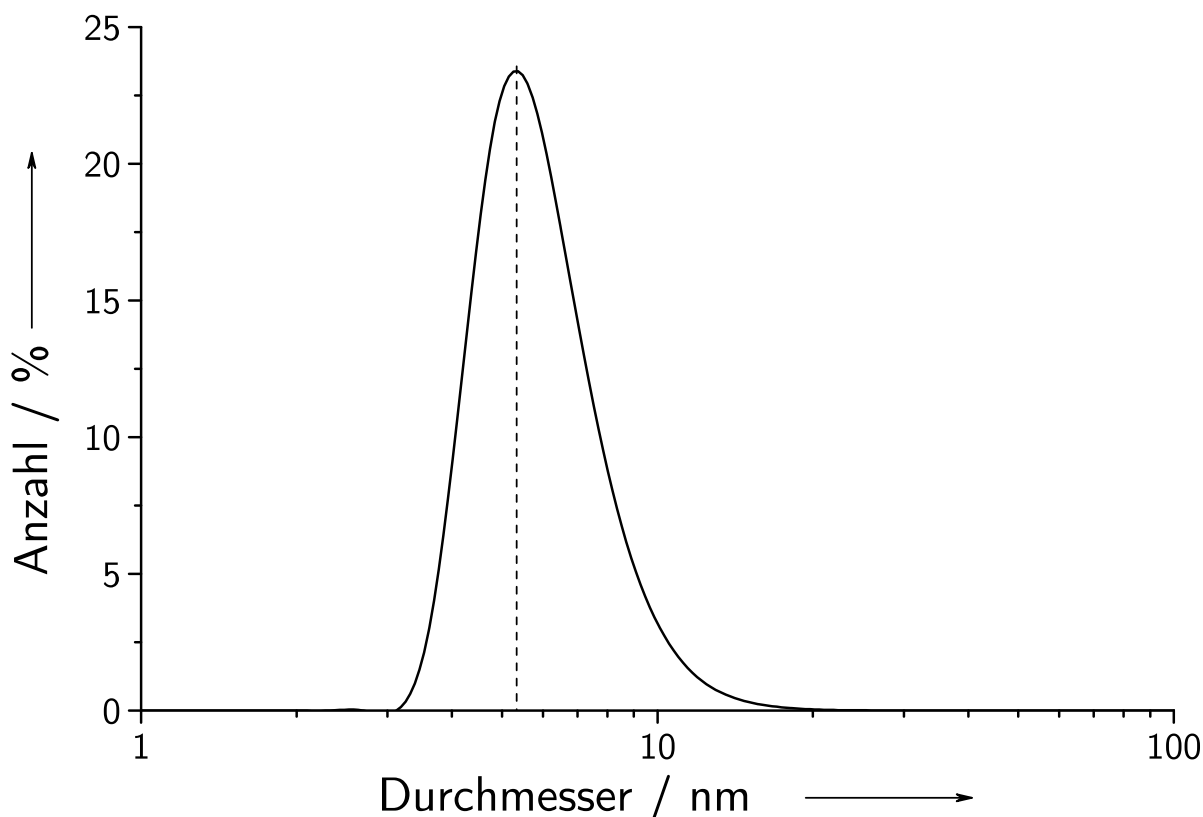


**Abb. 5.64:** Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen von Gold-Nanopartikeln nach der Reduktion von  $\text{HAuCl}_4$  mit Citrat und Gerbsäure und Stabilisierung durch PVP.

Die Größenverteilungen aus der Dynamischen Lichtstreuung nach der Intensität zeigten sehr stark variierende breite multimodale Verteilungen mit PDI im Bereich von 0,3 bis 0,8. Die Auftragungen nach der Anzahl lieferten Größenverteilungen, welche mit den Verteilungen der Scheibenzentrifugation vergleichbar sind. Eine exemplarische Größenverteilung nach der Anzahl von PVP-stabilisierten, zweifach zentrifugierten und in Reinstwasser redispersierten Gold-Nanopartikeln ist in Abbildung 5.65 gezeigt. Das Maximum der Verteilung lag bei 5,3 nm.

Durch Untersuchungen mittels SAXS wurden die Größenverteilung und die spezifische Oberfläche der Gold-Nanopartikel berechnet. Die mittleren Durchmesser der Gold-Nanopartikel lagen bei 5,3 nm und entsprachen damit nahezu exakt den mittels Scheibenzentrifugation und Dynamischer Lichtstreuung ermittelten Durchmessern.

In der durch Zentrifugation von überschüssigem Citrat, Gerbsäure, Polyvinylpyrrolidon und nicht reduzierten  $\text{Au}^{3+}$ -Ionen befreiten Gold-Nanopartikel-Dispersion kann mit dem mittleren Durchmesser der Gold-Nanopartikel ( $d=5$  nm), der Oberfläche eines Gold-Nanopartikels ( $A_{\text{NP}}$ , Gleichung 5.19), dem Volumen eines Gold-Nanopartikels ( $V_{\text{NP}}$ , Gleichung 5.20) und der Dichte von Gold die spezifische Oberfläche pro Masse Gold-Nanopartikel



**Abb. 5.65:** Größenverteilungen (DLS) von Gold-Nanopartikeln nach der Reduktion von  $\text{HAuCl}_4$  mit Citrat und Gerbsäure und Stabilisierung mit PVP.

( $a_m / \text{m}^2 \text{g}^{-1}$ ) angegeben werden (Gleichung 5.21).

$$A_{\text{NP}} = \pi d^2 = 2,5\pi \cdot 10^{-17} \text{ m}^2 = 7,854 \cdot 10^{-17} \text{ m}^2 \quad (5.19)$$

$$V_{\text{NP}} = \frac{\pi}{6} d^3 = \frac{\pi}{6} \cdot 1,25 \cdot 10^{-25} \text{ m}^3 = 6,545 \cdot 10^{-26} \text{ m}^3 \quad (5.20)$$

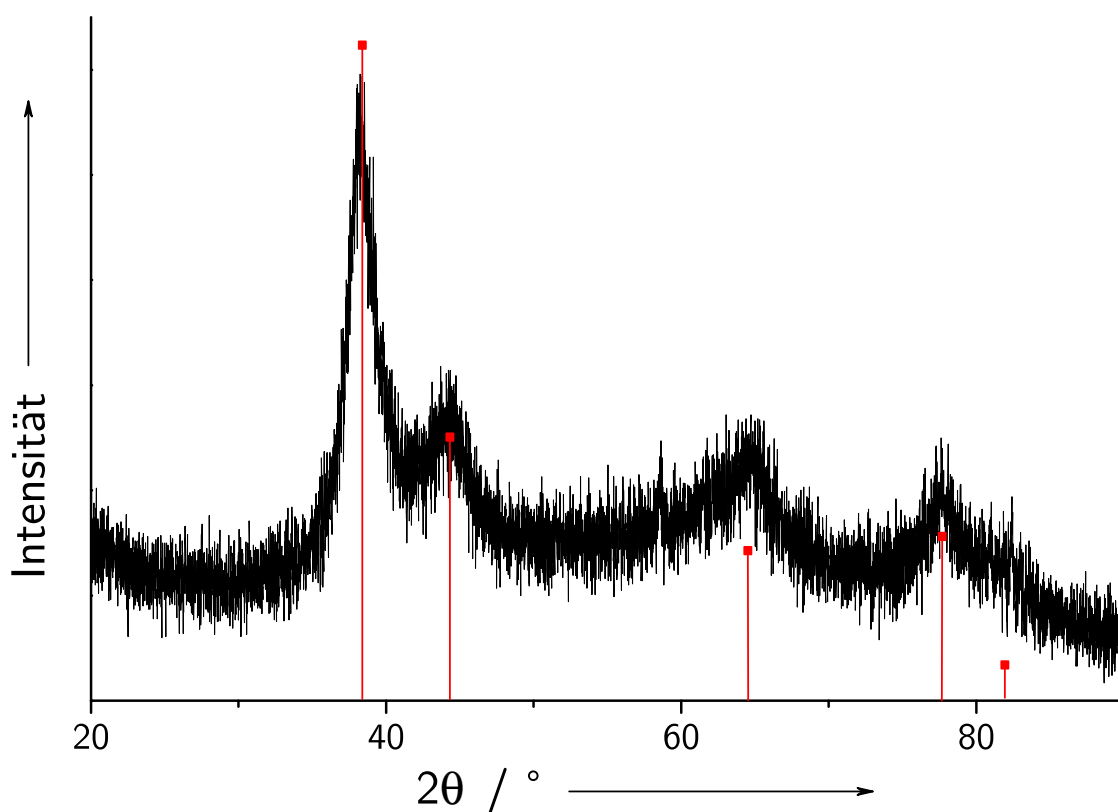
$$a_m = \frac{A_{\text{NP}}}{\rho V_{\text{NP}}} = \frac{7,854 \cdot 10^{-17} \text{ m}^2}{1,932 \cdot 10^7 \text{ g m}^{-3} \cdot 6,545 \cdot 10^{-26} \text{ m}^3} = 62,11 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1} \quad (5.21)$$

Die spezifische Oberfläche der Nanopartikel wurde mit den Gleichungen 5.19 bis 5.21 für einen Durchmesser von 5 nm zu  $62,11 \text{ m}^2 \text{g}^{-1}$  berechnet. Mittels SAXS wurde anhand der Größenverteilung ein Oberflächen-Volumen-Verhältnis von  $0,1465 \text{ nm}^{-1}$  ermittelt. Daraus ergibt sich eine spezifische Oberfläche der Nanopartikel von  $75,83 \text{ m}^2 \text{g}^{-1}$ . Hier wurden die Oberfläche-zu-Volumen-Verhältnisse aller in der Dispersion vorhandenen Nanopartikel berücksichtigt und über die gesamte Größenverteilung der SAXS-Messung integriert. Anhand des mittleren Durchmessers der SAXS-Messung ergibt sich nach Gleichungen 5.21



eine spezifische Oberfläche von  $59,04 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ . Die berechneten spezifischen Oberflächen weichen schon aufgrund geringer Abweichungen der, für die Berechnung zugrunde liegenden Durchmesser, stark voneinander ab. Die SAXS-Messung liefert hier unter Berücksichtigung der gesamten Größenverteilung die genaueste Angabe der spezifischen Oberfläche.

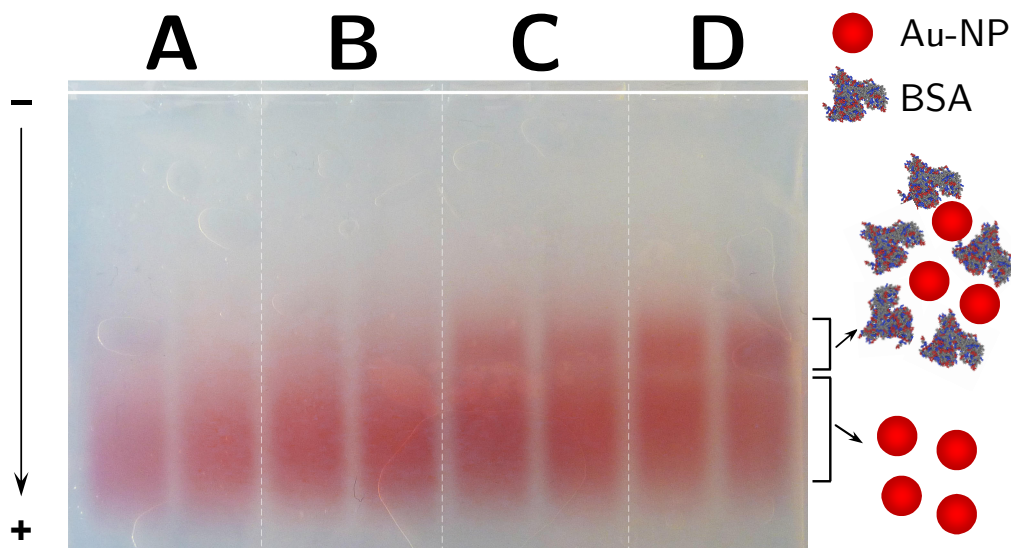
Die Polyvinylpyrrolidon-stabilisierten Gold-Nanopartikel wurden röntgenpulverdiffraktometrisch untersucht. Die Beugungsreflexe zeigen kristallines Gold mit einer Gitterkonstante von  $a = 4,066 \pm 0,001 \text{ \AA}$  und einem Volumen der Elementarzelle von  $V = 67,23 \pm 0,03 \text{ \AA}^3$ . Die mit der Rietveld-Methode ermittelte Domänengröße lag bei 3 bis 4 nm. Diese entspricht in etwa der Größe von kleinen Gold-Nanopartikeln in der Dispersion. Größere Nanopartikel setzen sich demnach aus zwei Domänen zusammen.



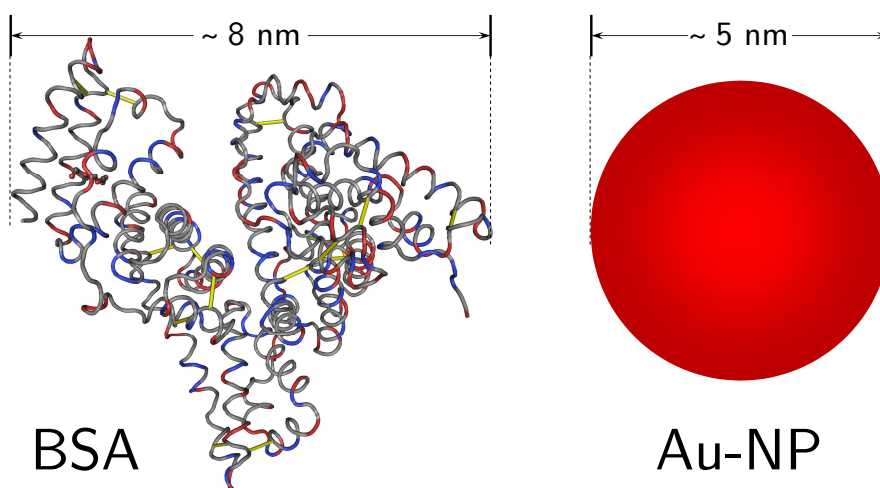
**Abb. 5.66:** Pulverdiffraktogramm von Gold-Nanopartikeln nach der Reduktion von  $\text{HAuCl}_4$  mit Citrat und Gerbsäure und Stabilisierung mit PVP. Es lassen sich die Beugungsreflexe von Gold erkennen (rote Linien).

Die Wechselwirkung zwischen PVP-stabilisierten Gold-Nanopartikeln und Rinderserumalbumin (BSA,  $66.463 \text{ Da}$ ) wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese untersucht. BSA wurde in Reinstwasser zu  $1 \text{ mg mL}^{-1}$  gelöst. Die Gold-Nanopartikel wurden bei Raumtemperatur für 30 Minuten mit BSA inkubiert. Das Stoffmengenverhältnis von BSA-Molekülen

zu Gold-Nanopartikeln ( $n:n$ ) wurde zwischen 0:1,0 und 14,5:1,0 variiert. Das Gesamtvolumen der Dispersion (140  $\mu\text{L}$ ) wurde durch Zugabe von Reinstwasser konstant gehalten. Die Gelelektrophorese wurde in einem 1 %-igen Agarosegel und TAE-Puffer bei 74 V für 30 Minuten durchgeführt.



**Abb. 5.67:** Agarose-Gelelektrophorese von PVP-stabilisierten Gold-Nanopartikeln nach Inkubation mit BSA. Die Stoffmengenverhältnisse von BSA-Molekülen zu Gold-Nanopartikeln ( $n:n$ ) betrugen 0:1,0 (A), 3,6:1,0 (B), 9,1:1,0 (C) und 14,5:1,0 (D).



**Abb. 5.68:** Struktur von Rinderserumalbumin (BSA).<sup>[506]</sup> Zum Größenvergleich ist schematisch ein kugelförmiges Gold-Nanopartikel maßstabsgetreu abgebildet.

In Abbildung 5.67 ist das erhaltene Agarosegel abgebildet. Mit zunehmendem Verhältnis von BSA zu Gold-Nanopartikeln lässt sich eine zweite Bande erkennen, die sich deutlich

von der ersten Bande absetzt. Die Konformation von BSA in Lösung lässt sich geometrisch als abgeflachtes Ellipsoid beschreiben. Untersuchungen mit Kleinwinkel-Röntgenstreuung zeigten, dass die Länge der längsten Achse des Ellipsoids etwa 8 nm beträgt. BSA besitzt eine hohe Ladungsdichte aufgrund der 99 Carboxylfunktionen saurer und 82 Aminofunktionen basischer Aminosäuren. Das Molekül ist über einen weiten pH-Bereich negativ geladen. Der isoelektrische Punkt liegt bei  $pI \approx 4,6$ .<sup>[507]</sup> In Abbildung 5.68 ist die Struktur von BSA dargestellt.<sup>[506]</sup> Saure Aminosäuren sind rot und basische Aminosäuren sind blau dargestellt. Disulfidbrücken sind gelb eingefärbt.

Brewer *et al.* berechneten eine maximale Belegung von BSA-Molekülen an der Oberfläche von Citrat-stabilisierten Gold-Nanopartikeln mit  $3,7 \cdot 10^{12} \text{ cm}^{-2}$  (BSA-Moleküle  $\text{cm}^{-2}$ ).<sup>[508]</sup> Das Verhältnis von BSA-Molekülen zur Goldoberfläche der, in dieser Arbeit synthetisierten, PVP-stabilisierten Gold-Nanopartikel wurde berechnet.

Die mittels SAXS ermittelte spezifische Oberfläche der Gold-Nanopartikel wurde zur Berechnung des Stoffmengenverhältnisses von BSA-Molekülen zur Goldoberfläche herangezogen (Tabelle 5.16). Durch die Multiplikation der spezifischen Oberfläche pro Masse ( $c_{\text{Au}} / \text{m}^2 \text{ g}^{-1}$ ) mit der Goldkonzentration in der Dispersion ( $c_{\text{Au}} / \text{g L}^{-1}$ ) ergibt sich die spezifische Oberfläche pro Volumen Gold-Nanopartikel-Dispersion ( $a_V$ , Gleichung 5.22).

$$a_V = \frac{c_{\text{Au}} A_{\text{NP}}}{\rho V_{\text{NP}}} = \frac{3,165 \cdot 10^{-1} \text{ g L}^{-1} \cdot 0,1465 \cdot 10^{10} \text{ m}^{-1}}{1,932 \cdot 10^7 \text{ g m}^{-3}} = 24,000 \text{ m}^2 \text{ L}^{-1} \quad (5.22)$$

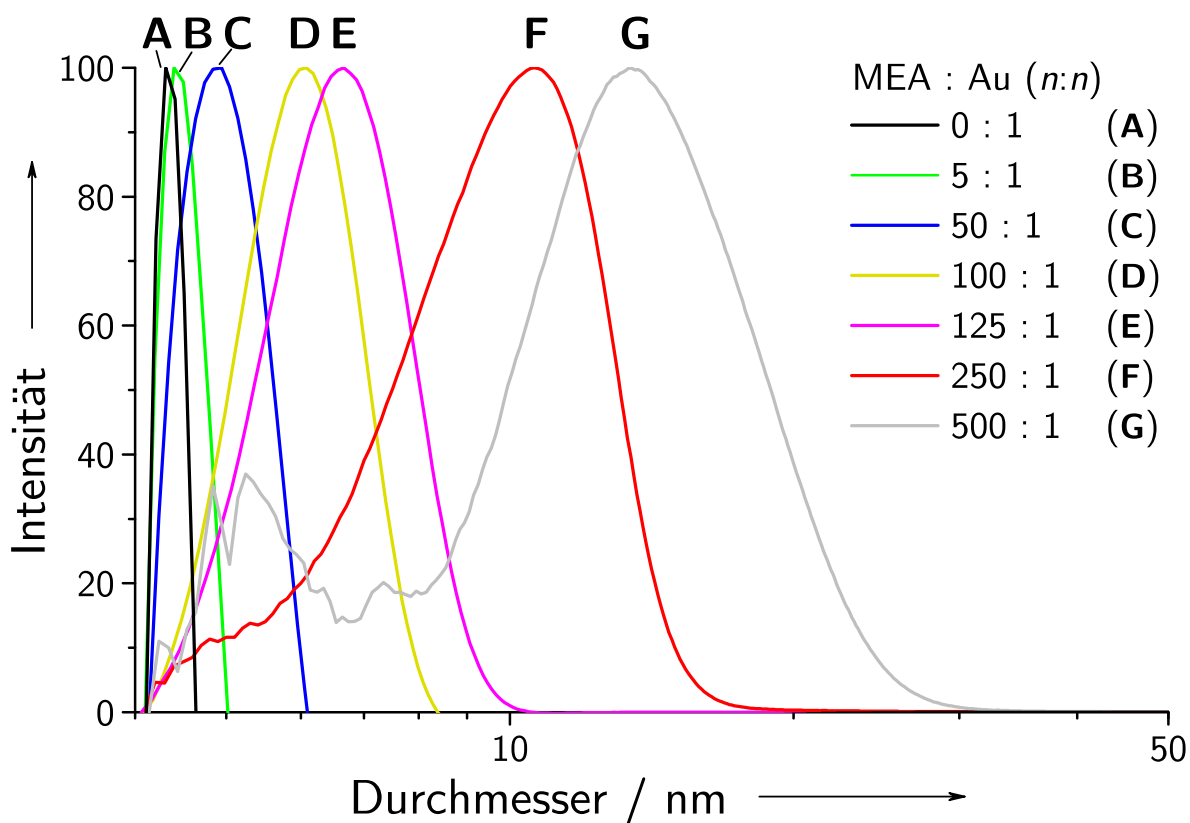
Übersteigt der BSA-Gehalt die maximale Belegung der Goldoberfläche deutlich (Abbildung 5.68, **C** und **D**), so werden die Gold-Nanopartikel in einem Netzwerk aus BSA-Molekülen zurückgehalten. Es lässt sich eine zweite Bande mit verkürzter Migrationsstrecke erkennen. Die PVP-stabilisierten Gold-Nanopartikel wurden aufgrund ihrer Stabilität für die Konjugation mit Antikörpern verwendet.

**Tab. 5.16:** Verhältnis von BSA-Molekülen zur Goldoberfläche PVP-stabilsierter Gold-Nanopartikel. Nach Brewer *et al.* ist der Anteil an der maximalen Belegung der Goldoberfläche angegeben.<sup>[508]</sup>

Ansatz	Au / mol	BSA / mol	BSA / $\text{cm}^{-2}$	Anteil an maximaler Belegung / % <sup>[508]</sup>
<b>A</b>	$1,61 \cdot 10^{-7}$	0	0	0
<b>B</b>	$1,61 \cdot 10^{-7}$	$1,50 \cdot 10^{-10}$	$3,78 \cdot 10^{12}$	102,04
<b>C</b>	$1,61 \cdot 10^{-7}$	$3,76 \cdot 10^{-10}$	$9,44 \cdot 10^{12}$	255,10
<b>D</b>	$1,61 \cdot 10^{-7}$	$6,02 \cdot 10^{-10}$	$1,51 \cdot 10^{13}$	408,15

### 5.9.2.2 Funktionalisierung mit Mercaptoethylamin

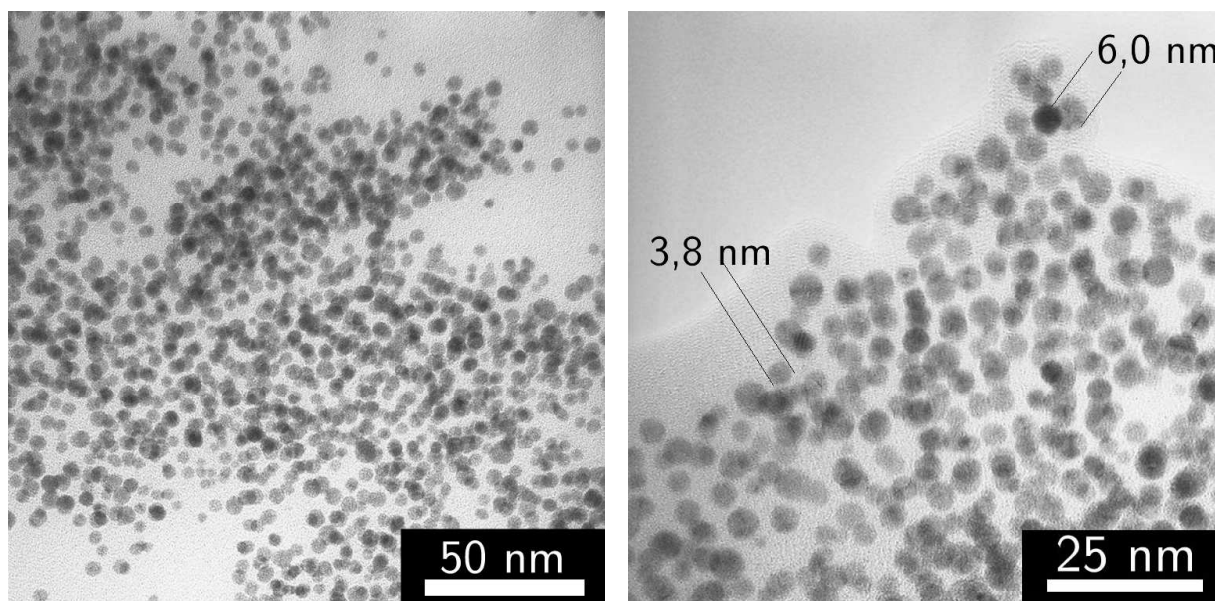
Ausgehend von Tetrachlorogoldsäure durch ein Gemisch aus Trinatriumcitrat und Gerbsäure reduzierte und stabilisierte Gold-Nanopartikel wurden mit Mercaptoethylamin umfunktionalisiert. Das Verhältnis von Mercaptoethylamin zu Gold ( $n:n$ ) wurde dabei zwischen 0:1 und 500:1 variiert. Die Größenverteilungen der Nanopartikel-Dispersionen wurden mit der Scheibenzentrifugation bestimmt. Mit zunehmendem Verhältnis von Mercaptoethylamin zu Gold konnten größere mittlere Durchmesser und breitere Größenverteilungen beobachtet werden (Abbildung 5.69). Die erhaltenen Dispersionen ließen sich nach der Zentrifugation bei 66.000 g nicht redispergieren.



**Abb. 5.69:** Größenverteilungen (DCS) von Gold-Nanopartikeln nach der Reduktion von  $\text{HAuCl}_4$  mit Citrat und Gerbsäure und Umfunktionalisierung mit Mercaptoethylamin. Die Verhältnisse von Mercaptoethylamin zu Gold ( $n:n$ ) betragen 0:1 (A), 5:1 (B), 50:1 (C), 100:1 (D), 125:1 (E), 250:1 (F) und 500:1 (G). Mit zunehmendem Verhältnis von MEA zu Gold steigt der mittlere Durchmesser an und die Verteilungen sind stark verbreitert.

In Abbildung 5.70 sind transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen MEA-funktionalisierter Gold-Nanopartikel mit einem Verhältnis von Mercaptoethylamin zu Gold ( $n:n$ )

von 50:1 (links) und 250:1 (rechts) gezeigt. Die Nanopartikel zeigen eine kugelförmige Morphologie mit Kerndurchmessern von 3,8 bis 6,0 nm. Mit zunehmendem Verhältnis von Mercaptoethylamin zu Gold weichen die transmissionselektronenmikroskopisch ermittelten Kerndurchmesser stark von den gemessenen mittleren Durchmessern der Scheibenzentrifugation ab. Bei einem Verhältnis MEA zu Gold von 250:1 (Abbildung 5.70, rechts) ist deutlich eine kontrastarme Schicht um die Nanopartikel erkennbar. Der Thiol-Ligand bewirkt eine Aggregation der Nanopartikel, so dass in der Scheibenzentrifugation deutlich größere mittlere Durchmesser detektiert werden.



**Abb. 5.70:** Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen von Gold-Nanopartikeln nach der Reduktion von  $\text{HAuCl}_4$  mit Citrat und Gerbsäure und der Umfunktionalisierung mit MEA mit einem Verhältnis von Mercaptoethylamin zu Gold ( $n:n$ ) von 50:1 (links) und 250:1 (rechts).

Aufgrund der geringen Stabilität der MEA-funktionalisierten Gold-Nanopartikel wurden PVP-stabilisierte und mit Citrat und Gerbsäure reduzierte Gold-Nanopartikel zur Umfunktionalisierung mit MEA verwendet. Die Verhältnisse von MEA zu Gold ( $n:n$ ) wurden dabei im Bereich von 0,44:1,00 bis 4,37:1,00 variiert. Verhältnisse kleiner 0,44:1,00 führten zur sofortigen Aggregation der Gold-Nanopartikel. In Tabelle 5.17 sind die Parameter der Umfunktionalisierung mit MEA angegeben.

Die Goldkonzentration der Gold-Nanopartikel-Dispersion nach zweifacher Zentrifugation und Redispersion in Reinstwasser betrug  $3,165 \cdot 10^{-1} \text{ g L}^{-1}$  ( $1,607 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ). Die Konzentration der wässrigen Lösung von Mercaptoethylamin betrug  $7,985 \cdot 10^{-1} \text{ g L}^{-1}$  ( $7,03 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ). Wurde *et al.* geben die maximale Belegung einer Goldoberfläche mit

Mercaptoethylamin mit  $\approx 1 \cdot 10^{-9} \text{ mol cm}^{-2}$  an.<sup>[323]</sup> Xiu *et al.* und Adrias *et al.* gehen von einer theoretisch maximalen Belegung von  $8 \cdot 10^{-10} \text{ mol cm}^{-2}$  aus. Die gemessene Belegung liegt bei  $5,7 \pm 0,1 \cdot 10^{-10} \text{ mol cm}^{-2}$ .<sup>[324,509]</sup>

Im Falle der mit Polyvinylpyrrolidon und Citrat/Gerbsäure stabilisierten Gold-Nanopartikel kann das Verhältnis von Mercaptoethylamin zur Oberfläche angegeben werden. Die spezifische Oberfläche ( $a_V / \text{m}^2 \text{ g}^{-1}$ ) einer Dispersion von kugelförmigen Gold-Nanopartikeln mit einem Durchmesser von  $d=5 \text{ nm}$  kann mit den Gleichungen 5.19 bis 5.21 und Gleichung 5.22 in Abschnitt 5.9.2.1 berechnet werden.

Mit der bekannten Partikeloberfläche der Gold-Dispersion lässt sich der Anteil an der maximalen theoretischen Belegung der Goldoberfläche berechnen.<sup>[324,509]</sup> In Tabelle 5.17 ist der Anteil von MEA an der maximalen theoretischen Belegung auf der Goldoberfläche bei der Umfunktionalisierung angegeben.

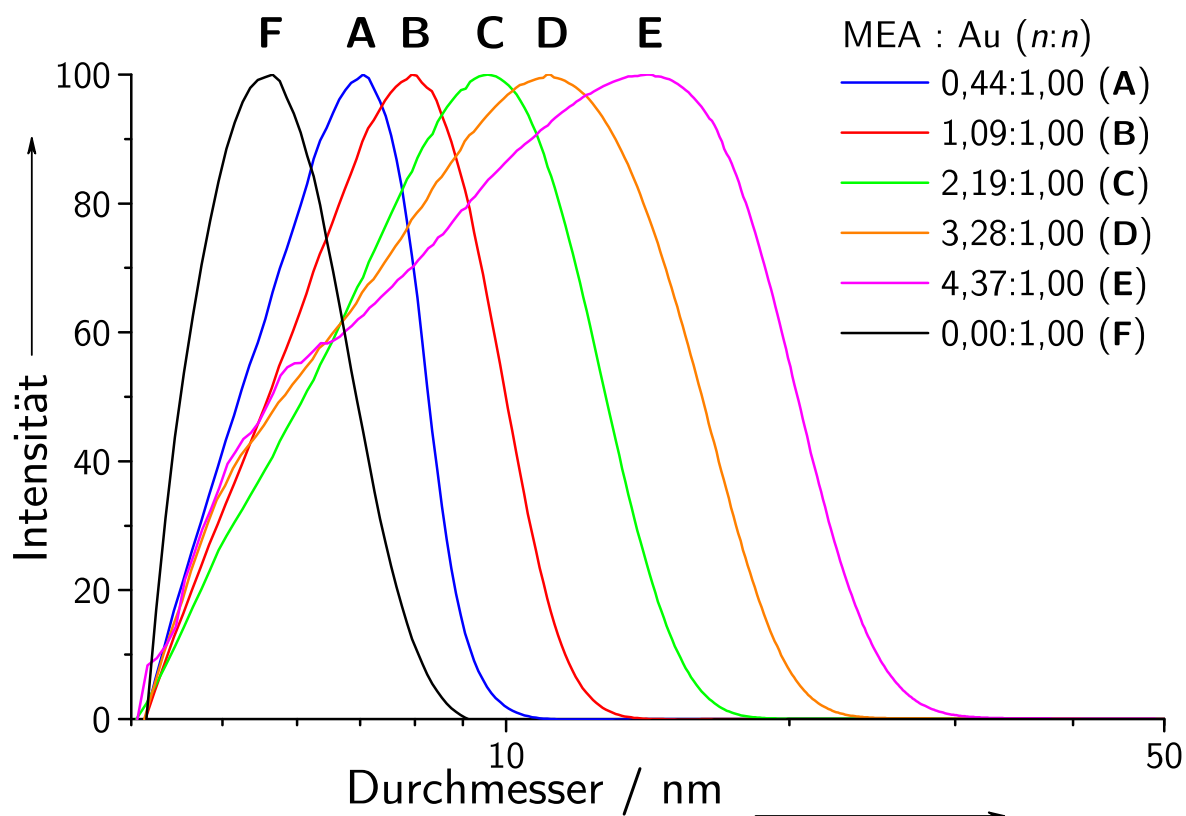
**Tab. 5.17:** Versuchsparmeter der Umfunktionalisierung von PVP-stabilisierten Gold-Nanopartikeln mit MEA.

Ansatz	Au / mol	MEA / mol	MEA:Au	Anteil an maximaler Belegung / % <sup>[324,509]</sup>
A	$1,61 \cdot 10^{-7}$	$7,028 \cdot 10^{-8}$	0,44	366,06
B	$1,61 \cdot 10^{-7}$	$1,757 \cdot 10^{-7}$	1,09	915,16
C	$1,61 \cdot 10^{-7}$	$3,514 \cdot 10^{-7}$	2,19	1830,32
D	$1,61 \cdot 10^{-7}$	$5,271 \cdot 10^{-7}$	3,28	2745,48
E	$1,61 \cdot 10^{-7}$	$7,028 \cdot 10^{-7}$	4,37	3660,64
F	$1,61 \cdot 10^{-7}$	0	0	0,00

Die tatsächlich adsorbierte Menge an MEA lässt sich hieraus nicht ableiten, da sich die Nanopartikel bei Zugabe von MEA zu größeren Aggregaten zusammenlagerten. Die Größenverteilungen der Scheibenzentrifugation der erhaltenen Dispersionen sind in Abbildung 5.71 gezeigt.

Durch die Zugabe des Thiol-Liganden zeigten sich eine Zunahme der mittleren Durchmesser und Verbreiterungen der Größenverteilungen.

Das Migrationsverhalten der Gold-Nanopartikel in einem Agarosegel (1 %) in TAE-Puffer (pH=8,5) bei einer Spannung von 74 V für 90 Minuten zeigte eine den Größenverteilungen der Scheibenzentrifugation entsprechende Charakteristik. Mit zunehmenden mittleren Durchmessern der Größenverteilungen (Abbildung 5.71) zeigen die Nanopartikel ein verlangsamtes Migrationsverhalten im Agarosegel (Abbildung 5.72). Das verlangsamte Migrationsverhalten kann durch die zunehmende Aggregation der Gold-Nanopartikel und



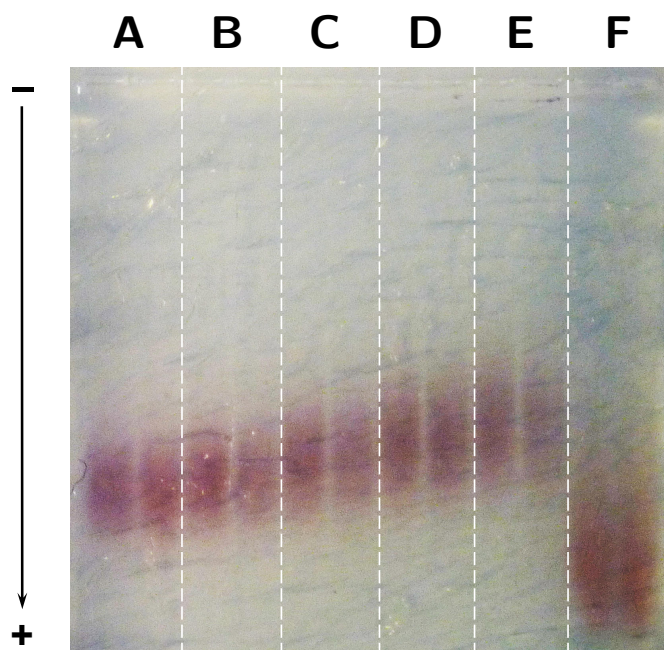
**Abb. 5.71:** Größenverteilungen (DCS) von PVP-stabilisierten Gold-Nanopartikeln nach der Reduktion von  $\text{HAuCl}_4$  mit Citrat und Gerbsäure und Umfunktionalisierung mit MEA. Die Verhältnisse von Mercaptoethylamin zu Gold ( $n:n$ ) betrugen 0,44:1,00 (A), 1,09:1,00 (B), 2,19:1,00 (C), 3,28:1,00 (D), 4,37:1,00 (E) und 0,00:1,00 (F).

durch eine Abnahme der Oberflächenladung erklärt werden. Bei  $\text{pH}=8,5$  liegen die Aminofunktionen des Mercaptoethylamins zu 70 % deprotoniert als ungeladene  $\text{NH}_2$ -Gruppen vor (Abbildung 4.6, Abschnitt 4.4.4).

Die Migration der Gold-Nanopartikel zur Anode deutet auf eine insgesamt negative Ladung der Gold-Nanopartikel hin. Die Zugabe von MEA bewirkt somit keine Umladung, sondern eine Aggregation der Gold-Nanopartikel, wodurch die Migrationsstrecke im Agarosegel verkürzt wird.

Die Stabilität der MEA-funktionalisierten Gold-Nanopartikel-Dispersionen lag in allen Fällen im Bereich weniger Stunden. Die Zentrifugation bei 66.000 g führte zu irreversibler Aggregation der Nanopartikel. Mercaptoethylamin kann als heterofunktionaler Ligand sowohl über die Thiofunktion als auch über die Aminofunktion eine schwache kovalente Bindung zur Goldoberfläche ausbilden. Dabei können Gold-Nanopartikel verbrückt wer-





**Abb. 5.72:** Agarose-Gelelektrophorese von MEA-funktionalisierten Gold-Nanopartikeln. Mit zunehmendem Stoffmengenverhältnis von Mercaptoethylamin zu Gold nimmt die Migrationsstrecke ab. Die violette Färbung der Dispersionen deutet auf eine partielle Aggregation der Partikel hin. Die Verhältnisse von MEA zu Gold ( $n:n$ ) betrugen 0,44:1,00 (A), 1,09:1,00 (B), 2,19:1,00 (C), 3,28:1,00 (D), 4,37:1,00 (E) und 0,00:1,00 (F). Die Laufrichtung ist mit einem Pfeil angedeutet.

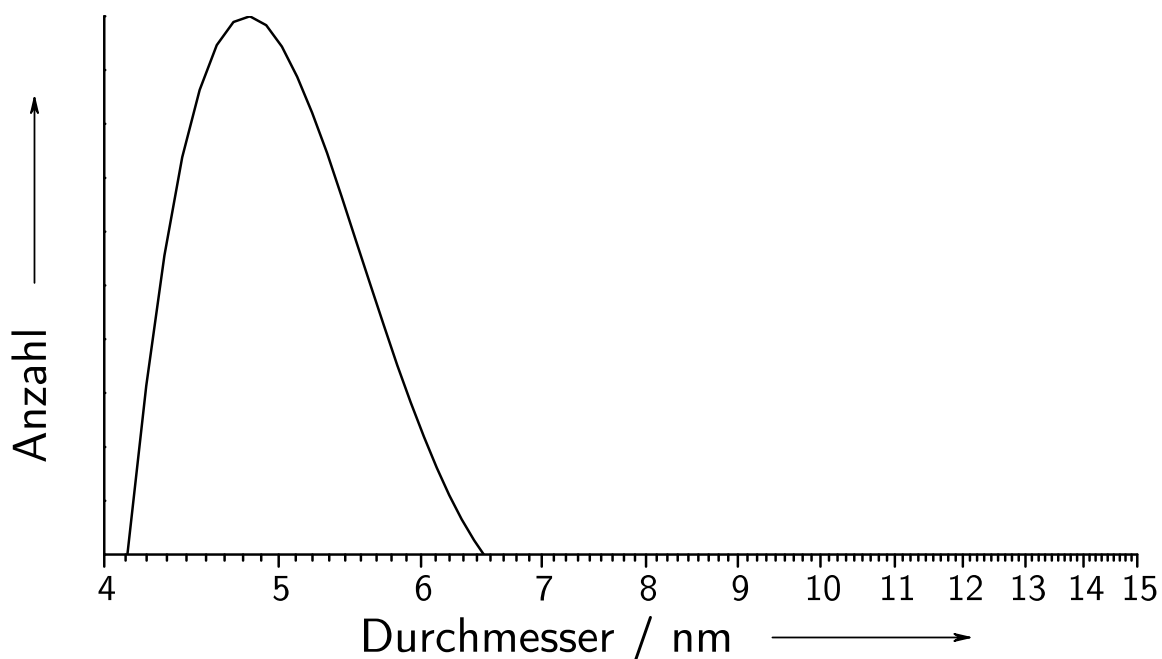
den, oder das Thiol und das primäre Amin können in einer gewinkelten Konformation an die gleiche Oberfläche binden.<sup>[324]</sup> In allen Fällen wird so die Stabilität der Dispersionen vermindert. Aufgrund der geringen Stabilität der Mercaptoethylamin-funktionalisierten Gold-Nanopartikel und der irreversiblen Aggregation durch die Zentrifugation wurden keine Versuche zur Anbindung von Antikörpern durchgeführt.

### 5.9.2.3 Funktionalisierung mit (*RS*)-Liponsäure

Mit (*RS*)-Liponsäure funktionalisierte Gold-Nanopartikel wurden nach zwei verschiedenen Ansätzen synthetisiert. Nach Ansatz 1 wurden die mit Citrat und Gerbsäure reduzierten Gold-Nanopartikel nach der Synthese (Abschnitt 5.9.2) mit (*RS*)-Liponsäure, gelöst in Ethanol, versetzt. Das Stoffmengenverhältnis von Liponsäure zu Gold wurde mit 3:1 im Überschuss gewählt. Der pH-Wert der Dispersion wurde mit NaOH auf pH=8 eingestellt. Die Dispersionen wurden dreifach bei 66.000 g für 30 Minuten zentrifugiert und jeweils in Reinstwasser redispergiert. Der Goldgehalt wurde mit der AAS bestimmt.



In Abbildung 5.73 ist die Größenverteilung der Scheibenzentrifugation nach der Anzahl von (*RS*)-Liponsäure-funktionalisierten Gold-Nanopartikeln nach dreifacher Zentrifugation und Redisperion in Reinstwasser gezeigt. Die Größenverteilung veränderte sich durch die Umfunktionalisierung mit (*RS*)-Liponsäure im Vergleich zu mit Citrat und Gerbsäure stabilisierten Gold-Nanopartikeln nicht.



**Abb. 5.73:** Größenverteilungen (DCS) von mit (*RS*)-Liponsäure umfunktionalisierten Gold-Nanopartikeln.

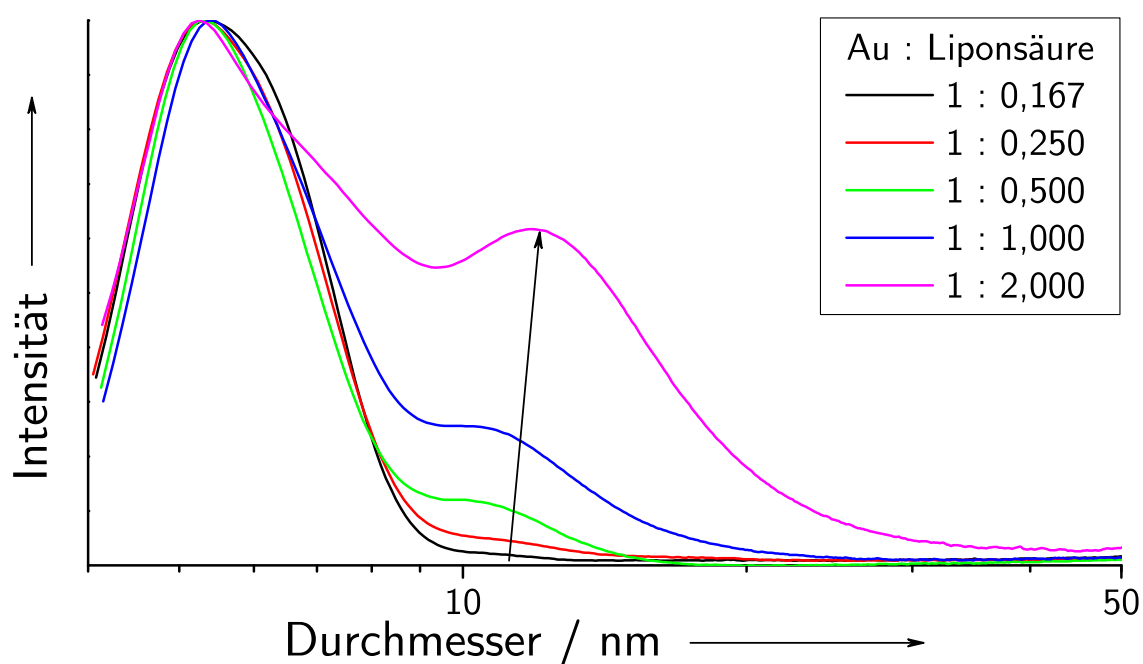
Die Gold-Nanopartikel ließen sich nach der Umfunktionalisierung zentrifugieren und in Reinstwasser redispergieren. Die Stabilisierung durch die (*RS*)-Liponsäure verhinderte die Aggregation der Gold-Nanopartikel, wie es bei mit Citrat und Gerbsäure stabilisierten Gold-Nanopartikeln beobachtet wurde.

Nach Ansatz 2 wurden die mit Citrat und Gerbsäure reduzierten Gold-Nanopartikel nach der Synthese mit PVP versetzt (Abschnitt 5.9.2.1), zweifach bei 66.000 g zentrifugiert und in Reinstwasser redispergiert. Die von überschüssigem Citrat, Gerbsäure und PVP befreiten Gold-Nanopartikel ließen sich durch Zugabe von (*RS*)-Liponsäure umfunktionalisieren. Das Verhältnis von (*RS*)-Liponsäure zu Gold wurde entsprechend Tabelle 5.18 variiert. Die Ansätze wurden für 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die Gold-Nanopartikel wurden dreifach bei 66.000 g für 30 Minuten zentrifugiert und in Reinstwasser redispergiert. Der Überstand wurde jeweils verworfen.

**Tab. 5.18:** Verhältnis von (*RS*)-Liponsäure zu Gold bei der Umfunktionalisierung der PVP-stabilisierten Gold-Nanopartikel.

Ansatz	Au / mol	( <i>RS</i> )-Liponsäure / mol	( <i>RS</i> )-Liponsäure: Au ( <i>n:n</i> )
<b>A</b>	$1,00 \cdot 10^{-7}$	$1,67 \cdot 10^{-8}$	0,167 : 1,000
<b>B</b>	$1,00 \cdot 10^{-7}$	$2,50 \cdot 10^{-8}$	0,250 : 1,000
<b>C</b>	$1,00 \cdot 10^{-7}$	$5,00 \cdot 10^{-8}$	0,500 : 1,000
<b>D</b>	$1,00 \cdot 10^{-7}$	$1,00 \cdot 10^{-7}$	1,000 : 1,000
<b>E</b>	$1,00 \cdot 10^{-7}$	$2,00 \cdot 10^{-7}$	2,000 : 1,000

Die Größenverteilungen der Scheibenzentrifugation sind in Abbildung 5.74 nach Zentrifugation bei 66.000 g für 30 Minuten und Redispersion in Reinstwasser gezeigt.

**Abb. 5.74:** Größenverteilungen (DCS) von mit (*RS*)-Liponsäure umfunktionalisierten PVP-stabilisierten Gold-Nanopartikeln.

Mit steigendem Stoffmengenverhältnis von (*RS*)-Liponsäure zu Gold lässt sich immer deutlicher ein zweites Maximum in den Größenverteilungen erkennen. Die bei kleinen Durchmessern einheitlichen Maxima liegen bei 5,3 bis 5,4 nm. Die zweiten Maxima liegen bei Durchmessern, welche um den Faktor 2 höhere Beträge zeigen. Die Gold-Nanopartikel aggregieren bei hohen Stoffmengenverhältnissen von (*RS*)-Liponsäure zu Gold. Ein ähnliches

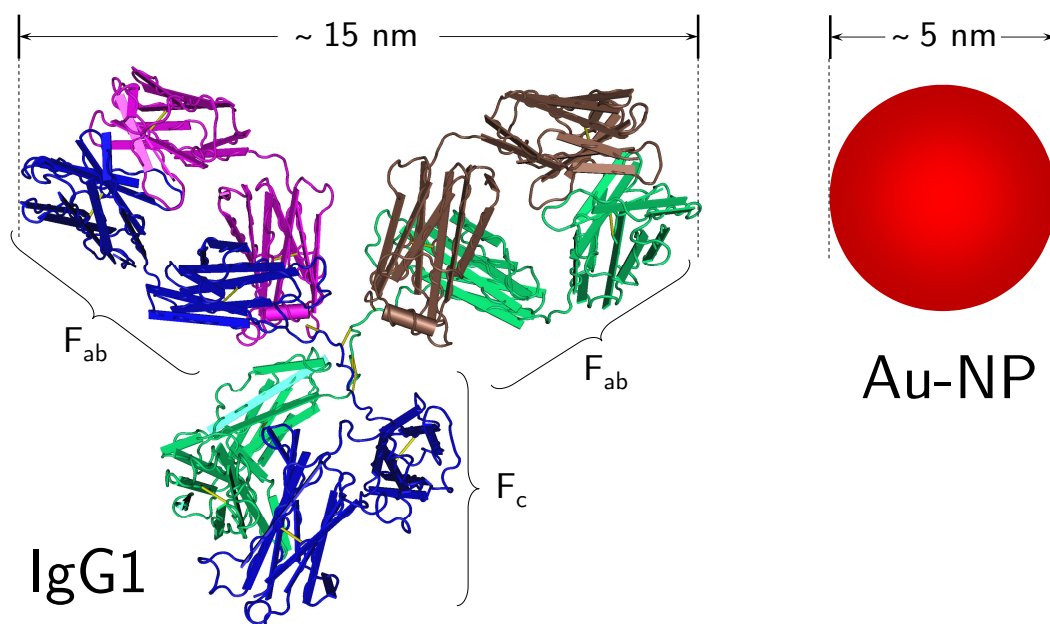
Verhalten wurde bei (*RS*)-Liponsäure stabilisierten Gold-Nanopartikeln beobachtet, welche durch die Reduktion von  $\text{HAuCl}_4$  mit Natriumborhydrid hergestellt wurden. Die transmissionsmikroskopischen Aufnahmen (Abschnitt 5.9.1.2, Abbildung 5.56) zeigten längliche Nanopartikel, welche durch Aggregation von jeweils zwei Gold-Nanopartikeln entstanden waren.

Die nach Ansatz 1 hergestellten, mit (*RS*)-Liponsäure umfunktionalisierten, Gold-Nanopartikel wurden für Untersuchungen der Wechselwirkungen mit Antikörpern verwendet. Die nach Ansatz 2 hergestellte PVP-stabilisierten und mit (*RS*)-Liponsäure umfunktionalisierten Gold-Nanopartikel wurden aufgrund der partiellen Aggregation nach Zugabe von (*RS*)-Liponsäure nicht für Untersuchungen der Wechselwirkungen mit Antikörpern verwendet.

## 5.10 Antikörper-Gold-Nanopartikel-Konjugate

Die Wechselwirkung zwischen Gold-Nanopartikeln und IgG-Antikörpern wurden mit (*RS*)-Liponsäure-stabilisierten Gold-Nanopartikeln und mit PVP-stabilisierten Gold-Nanopartikeln untersucht. Die Gold-Nanopartikel wurden durch Reduktion von Tetrachlorogold-säure mit einem Gemisch aus Citrat und Gerbsäure (Abschnitt 4.4.2) hergestellt und mit ethanolischer Lösung von (*RS*)-Liponsäure umfunktionalisiert (Abschnitt 5.9.2.3) oder mit PVP stabilisiert (Abschnitt 5.9.2.1). Die Wechselwirkungen zwischen den Antikörpern und den Gold-Nanopartikeln wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese untersucht.

In Abbildung 5.75 ist maßstabsgetreu ein schematischer Vergleich der Größen der in dieser Studie verwendeten Gold-Nanopartikel und der IgG-Antikörper dargestellt. Die Größen von IgG-Antikörpern liegen in ihrer maximalen Ausdehnung bei etwa 15 bis 17 nm.<sup>[510–512]</sup> Die maximale Ausdehnung der Antikörper entspricht dem zwei- bis dreifachen Durchmesser der Gold-Nanopartikel.



**Abb. 5.75:** Größenvergleich zwischen Gold-Nanopartikeln und IgG-Antikörpern. IgG-Antikörpern bestehen aus den antigenbindenden Fragmenten (F<sub>ab</sub>) und einem F<sub>c</sub>-Fragment.<sup>[513]</sup>

Die mit Citrat und Gerbsäure reduzierten und mit (*RS*)-Liponsäure umfunktionalisierten Gold-Nanopartikel (Abschnitt 5.9.2.3, Ansatz 1) wurden mit unterschiedlichen Verhältnissen von Gold-Nanopartikeln zu Antikörpern inkubiert. Die Volumina und die Stoffmengen an gelösten Salzen wurden in allen Versuchen durch Zugabe entsprechender Mengen an Reinstwasser und phosphatgepufferter Kochsalzlösung konstant gehalten. Die Konjugation

der (*RS*)-Liponsäure-funktionalisierten Gold-Nanopartikel mit Antikörpern wurde durch Zugabe von EDC und NHS durchgeführt. In Kontrollexperimenten ohne EDC und NHS wurde die rein adsorptive Wechselwirkung zwischen den Antikörpern und den Nanopartikeln untersucht. Die Versuchsbedingungen sind in Tabelle 5.19 zusammengefasst.

**Tab. 5.19:** Stoffmengenverhältnisse zwischen IgG-Antikörpern und Gold-Nanopartikeln.

Ansatz	Antikörper:Gold-Nanopartikel ( <i>n:n</i> )	EDC:NHS:Gold-Nanopartikel ( <i>n:n:n</i> )
1	0,00 : 1,00	0 : 0 : 1
2	0,00 : 1,00	3846 : 3846 : 1
3	0,25 : 1,00	0 : 0 : 1
4	0,25 : 1,00	3846 : 3846 : 1
5	0,50 : 1,00	0 : 0 : 1
6	0,50 : 1,00	3846 : 3846 : 1
7	0,75 : 1,00	0 : 0 : 1
8	0,75 : 1,00	3846 : 3846 : 1
9	1,00 : 1,00	0 : 0 : 1
10	1,00 : 1,00	3846 : 3846 : 1
11	1,50 : 1,00	0 : 0 : 1
12	1,50 : 1,00	3846 : 3846 : 1
13	2,00 : 1,00	0 : 0 : 1
14	2,00 : 1,00	3846 : 3846 : 1
15	2,50 : 1,00	0 : 0 : 1
16	2,50 : 1,00	3846 : 3846 : 1
17	5,00 : 1,00	0 : 0 : 1
18	5,00 : 1,00	3846 : 3846 : 1

Die Ansätze in Tabelle 5.19 wurden für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Gold-Nanopartikel bei 66.000 g für 20 Minuten zentrifugiert und die Überstände verworfen. Der Bodensatz wurde in PBS redispergiert. Vor der Gelelektrophorese wurden die Antikörper-Gold-Nanopartikel-Konjugate mit dem Laufpuffer (30 % Saccharose in TAE-Puffer) zu einer Konzentration von 5 % Saccharose versetzt.

In Abbildung 5.76 ist die Aufnahme eines Agarose-Gels nach der Elektrophorese der Antikörper-Gold-Nanopartikel-Konjugate gezeigt. Die Gelelektrophorese wurde in einem 1 %-igen Agarose-Gel für 1 Stunde bei einer konstanten Spannung von 100 V in TAE-Puffer durchgeführt. Die Nummerierung entspricht der in Tabelle 5.19 beschriebenen Ansätze.

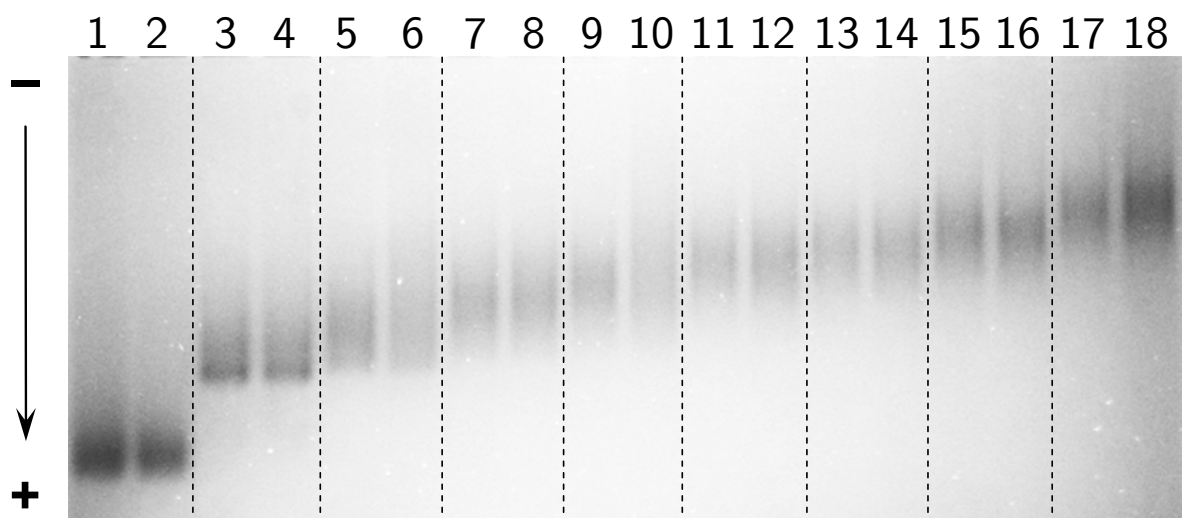


Abb. 5.76: Agarose-Gelelektrophorese von Antikörper-Gold-Nanopartikel-Konjugaten.

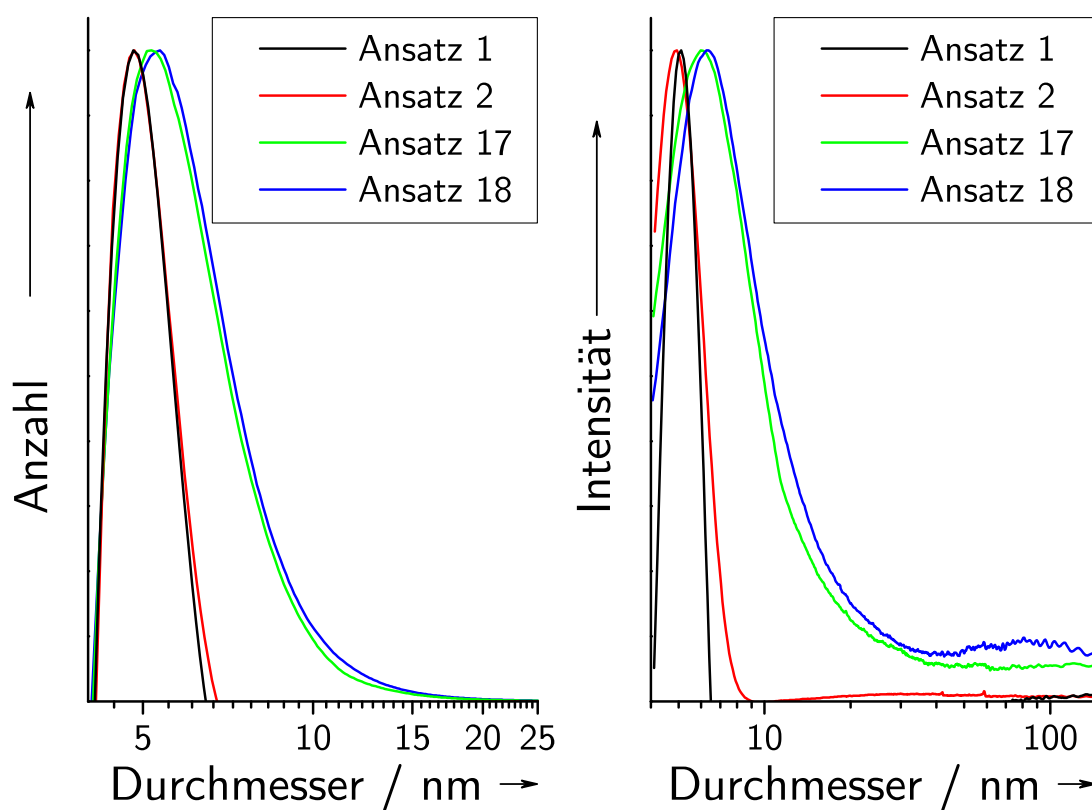


Abb. 5.77: Größenverteilungen (DCS) von Antikörper-Gold-Nanopartikel-Konjugaten. Die Verteilungen nach der Anzahl sind links, die Verteilungen nach der Intensität des gestreuten Lichts sind rechts aufgetragen.

Es lässt sich erkennen, dass sich die Migrationsstrecken zwischen den mit EDC und NHS konjugierten und den rein adsorptiv wechselwirkenden Antikörper-Gold-Nanopartikel-Konjugaten nicht unterscheiden. Mit steigendem Verhältnis von Antikörpern zu Gold-Nanopartikeln zeigten die Konjugate kürzere Migrationsstrecken.

Die Größenverteilungen (DCS) der Antikörper-Gold-Nanopartikel-Konjugate sind in Abbildung 5.77 gezeigt. Bei einem Verhältnis von Antikörpern zu Gold-Nanopartikeln ( $n:n$ ) von 5,00:1,00 (Ansätze **17** und **18**) wurden im Vergleich zu Gold-Nanopartikeln ohne die Inkubation mit Antikörpern (Ansätze **1** und **2**) breitere Größenverteilungen gemessen. Die Maxima der Größenverteilungen zeigten ebenfalls größere Beträge. Es ließen sich keine Unterschiede zwischen den rein adsorptiv wechselwirkenden (Ansätze **1** und **17**) und den mit EDC und NHS gekoppelten (Ansätze **2** und **18**) Antikörper-Gold-Nanopartikel-Konjugaten feststellen. Die nahezu deckungsgleichen Größenverteilungen zeigten ein ähnliches Verhalten wie die identischen Migrationsstrecken im Agarose-Gel.

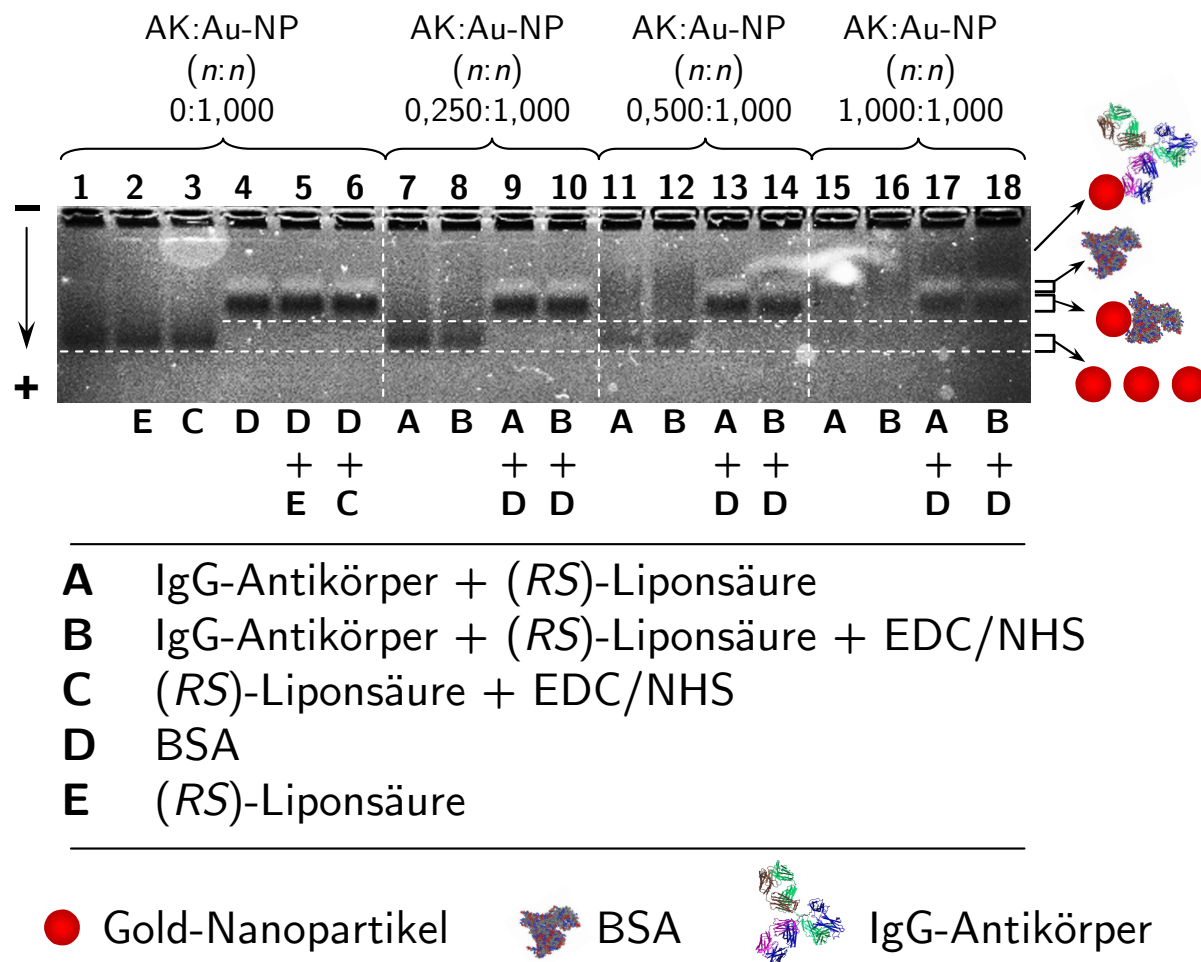
Die Konjugation von (*RS*)-Liponsäure mit IgG-Antikörpern wurde auch vor der Inkubation mit Gold-Nanopartikeln durchgeführt. Die verschiedenen Syntheseschritte sind in Tabelle 5.20 zusammengefasst. Die Kopplungen mit EDC und NHS wurden für 1 Stunde bei Raumtemperatur durchgeführt.

**Tab. 5.20:** Parameter der Konjugation von (*RS*)-Liponsäure mit IgG-Antikörpern. Alle Lösungen wurden in  $2 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1} \text{ Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$  Pufferlösung (pH=7,4) mit  $1,5 \cdot 10^{-1} \text{ mol L}^{-1} \text{ NaCl}$  angesetzt.

Ansatz	IgG / mol	( <i>RS</i> )-Liponsäure / mol	EDC / mol	NHS / mol	BSA / mol
<b>A</b>	$6,73 \cdot 10^{-9}$	$1,00 \cdot 10^{-8}$	—	—	—
<b>B</b>	$6,73 \cdot 10^{-9}$	$1,00 \cdot 10^{-8}$	$1,00 \cdot 10^{-5}$	$1,00 \cdot 10^{-5}$	—
<b>C</b>	—	$1,00 \cdot 10^{-8}$	$1,00 \cdot 10^{-5}$	$1,00 \cdot 10^{-5}$	—
<b>D</b>	—	—	—	—	$1,51 \cdot 10^{-5}$
<b>E</b>	—	$1,00 \cdot 10^{-8}$	—	—	—

Die (*RS*)-Liponsäure stabilisierten Gold-Nanopartikel wurden mit den in Tabelle 5.20 beschriebenen Ansätzen versetzt und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Verhältnisse von IgG-Antikörpern zu Gold-Nanopartikeln wurde mit 0:1,000, 0,250:1,000, 0,500:1,000 und 1,000:1,000 variiert. Die Gelelektrophorese der Antikörper-Gold-Nanopartikel-Konjugate wurden in einem 1 %-igen Agarose-Gel in TAE-Puffer bei pH=8,5 bei einer konstanten Spannung von 100 V durchgeführt. Das nach der Elektrophorese erhaltene

Agarose-Gel ist in Abbildung 5.78 gezeigt. Die Zusammensetzungen der Ansätze **1** bis **18** sind als Buchstabencode entsprechend Tabelle 5.20 unter den einzelnen Bahnen vermerkt.



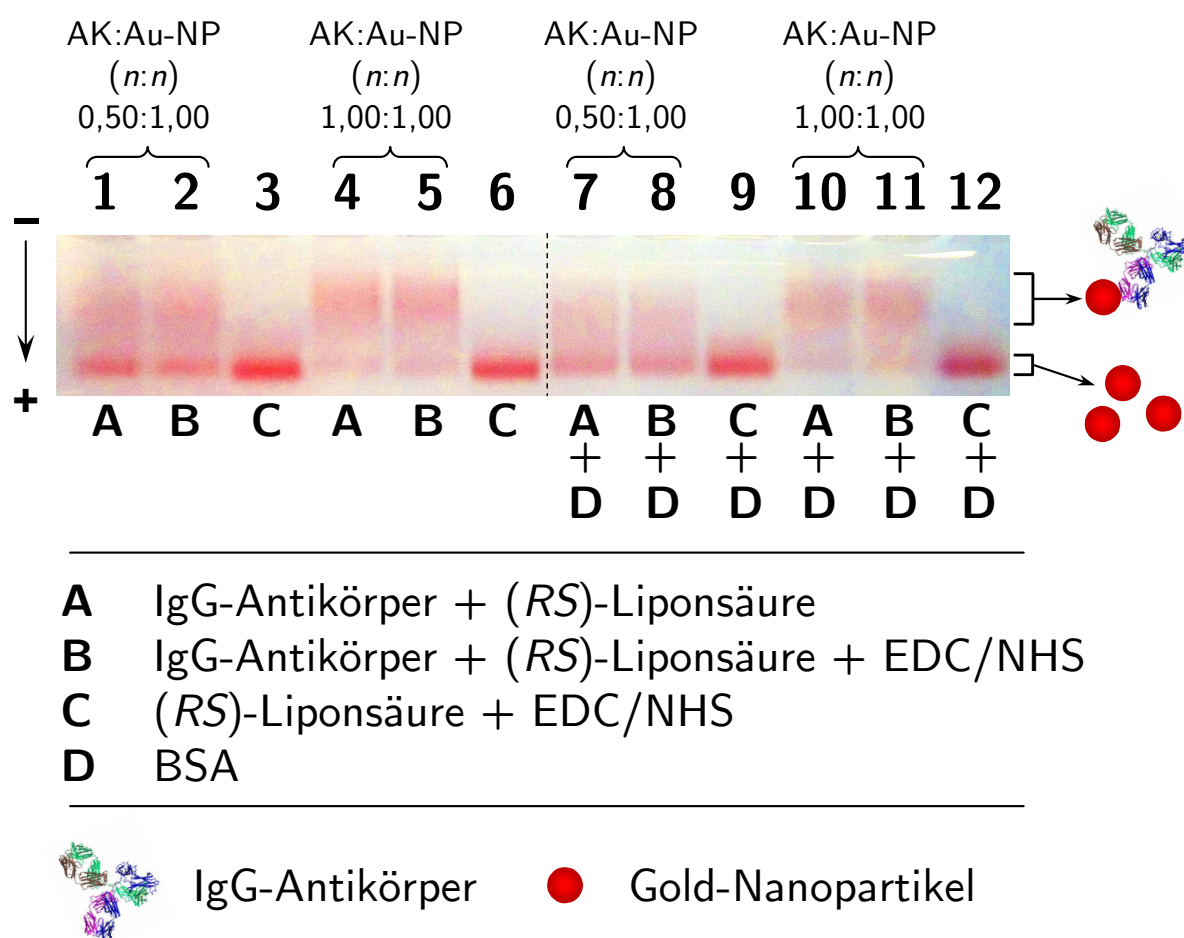
**Abb. 5.78:** Agarose-Gelelektrophorese von Antikörper-Gold-Nanopartikel-Konjugaten (*RS*)-Liponsäure-stabilisierter Gold-Nanopartikel.

Es lässt sich erkennen, dass die Zugaben von (*RS*)-Liponsäure (Ansatz **2**) und einem Gemisch aus (*RS*)-Liponsäure, EDC und NHS (Ansatz **3**) keinen Einfluss auf die Migrationstrecke der Nanopartikel im Vergleich zu reinen (*RS*)-Liponsäure-stabilisierten Gold-Nanopartikeln (Ansatz **1**) zeigen. Der Zusatz von BSA verkürzte die Migrationsstrecke der Gold-Nanopartikel (Ansätze **4** bis **6**). Es konnten auch hier keine Unterschiede zwischen reinen Gold-Nanopartikeln (Ansatz **4**), mit (*RS*)-Liponsäure versetzten Gold-Nanopartikeln (Ansatz **5**) und mit einem Gemisch aus (*RS*)-Liponsäure, EDC und NHS versetzten Gold-Nanopartikeln (Ansatz **6**) beobachtet werden. Die Zugabe von Antikörpern und (*RS*)-Liponsäure-Antikörper-Konjugaten zu den Gold-Nanopartikeln bewirkte eine Verminderung der Migrationsstrecke im Gel (Ansätze **7** bis **18**). Es konnten keine



Unterschiede zwischen rein adsorptiv wechselwirkenden (**A**) und mit Thiofunktionen versehenen IgG-Antikörpern (**B**) beobachtet werden (Ansätze **7** bis **18**). Die Zusatz von BSA verkürzte auch hier die Migrationsstrecke, wobei sich die adsorptiv wechselwirkenden und mit EDC und NHS gekoppelten IgG-Antikörper nicht unterschieden. Mit steigendem Verhältnis von Antikörpern zu Gold-Nanopartikeln ( $n:n$ ) nimmt die Stärke der vordersten Migrationsbande in Richtung der Anode deutlich ab. Die Bande der Gold-Nanopartikel ist über einen breiteren Bereich verschmiert.

PVP-stabilisierte Gold-Nanopartikel wurden mit den in Tabelle 5.20 beschriebenen Zusätzen **A** bis **D** versetzt und mit der Agarose-Gelelektrophorese untersucht. In Abbildung 5.79 ist die Aufnahme des Agarose-Gels nach der Elektrophorese der Antikörper-Gold-Nanopartikel-Konjugate gezeigt. Die Gelelektrophorese wurde in einem 1 %-igen Agarose-Gel für 25 Minuten bei einer konstanten Spannung von 100 V in TAE-Puffer durchgeführt.



**Abb. 5.79:** Agarose-Gelelektrophorese von Antikörper-Gold-Nanopartikel-Konjugaten PVP-stabilsierter Gold-Nanopartikel.

Es zeigte sich, dass die mit den Zusätzen **A** (Gemisch aus IgG-Antikörpern und (*RS*)-Liponsäure) und **B** (Gemisch aus IgG-Antikörpern, (*RS*)-Liponsäure, EDC und NHS) inkubierten Gold-Nanopartikel sich in ihren Migrationsverhalten im Agarosegel nicht unterschieden. Mit zunehmendem Verhältnis von Antikörpern zu Gold-Nanopartikeln wurde eine verkürzte Migrationsstrecke im Agarosegel beobachtet. Die Aktivierung der Carboxylfunktionen der (*RS*)-Liponsäure zeigt keinen Effekt auf das Migrationsverhalten (**3**, **6**, **9** und **12**).

Die Untersuchungen mittels Agarose-Gelelektrophorese und die kolloidchemische Untersuchungen mittels Scheibenzentrifugation zeigen, dass Antikörper eine sehr hohe Affinität zu Gold-Nanopartikeln besitzen. Es lassen sich keine Unterschiede erkennen, inwieweit eine kovalente Anbindung durch die Kopplung mit EDC und NHS eine stärkere Bindung zur Goldoberfläche bewirkt. Antikörper können über eine große Zahl von geladenen Gruppen an Goldoberflächen adsorbieren. Neben primären Aminogruppen und Carboxylgruppen können auch freie Thiolgruppen oder durch die Reduktion von Disulfidbrücken gebildete Thiolgruppen an die Oberfläche von Gold-Nanopartikeln koordinieren. Demnach ist der Übergang zwischen adsorptiver und kovalenter Wechselwirkung fließend. Die Wechselwirkungen sind hinreichend stark, so dass die elektrophoretische Mobilität der Gold-Nanopartikel stark vermindert wird.

In der Literatur finden sich Studien zur Untersuchung der Größe, Form und Ladung von Gold-Nanopartikeln mittels Agarose-Gelelektrophorese.<sup>[303,304]</sup> DNA-Gold-Nanopartikel-Konjugate lassen sich je nach Anzahl der DNA-Moleküle pro Gold-Nanopartikel auftrennen.<sup>[514,515]</sup> Als negativ geladenes Makromolekül liefert DNA einen Beitrag zur Gesamtladung des DNA-Gold-Nanopartikel-Konjugats. Proteine wie Antikörper sind in der Regel weitaus weniger stark geladen. Die elektrophoretische Mobilität des Antikörper-Gold-Nanopartikel-Konjugats ist somit wesentlich träger. Die bei der Adsorption von BSA an PVP-stabilisierten Gold-Nanopartikeln beobachtete Ausbildung einer zweiten Bande deutet auf eine Verbrückung der Gold-Nanopartikel mit BSA-Molekülen hin. Antikörper können theoretisch ähnliche Wechselwirkungen mit Gold-Nanopartikeln eingehen und unabhängig von der Bindungsart Gold-Nanopartikel verbrücken.

Die in dieser Arbeit untersuchten polyklonalen IgG-Antikörper des menschlichen Blutes zeigten eine hohe Bindungsaffinität sowohl zu den (*RS*)-Liponsäure-funktionalisierten Gold-Nanopartikeln als auch zu den PVP-stabilisierten Gold-Nanopartikeln. Unterschiede zwischen einer kovalenten Anbindung durch die Kopplung mit 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid und N-Hydroxysuccinimid und einer der starken adsorptiven Wechselwirkung konnten mittels Agarose-Gelelektrophorese und Scheibenzentrifugation nicht festgestellt werden.

## 6 Zusammenfassung und Ausblick

In dieser Arbeit wurden silberdotierte und undotierte Carboxymethylcellulose-stabilisierte und undotierte Chondroitinsulfat-stabilisierte Calciumphosphat-Nanopartikel hergestellt. Die kolloidchemische und festkörperchemische Charakterisierung der Partikelsysteme zeigte monodisperse kugelförmige Calciumphosphat-Nanopartikel mit mittleren Kerndurchmessern von 50 nm. Die Partikelsysteme ließen sich von überschüssigen Polyelektrolyten und Gegenionen durch Zentrifugation befreien. Die Langzeitstabilisierung wurde durch Gefriertrocknung in einer Trehalose-Matrix realisiert, wobei bei Redispersion in Reinstwasser der ursprüngliche kolloidale Charakter der Dispersionen erhalten werden konnte.

Die biologische Wirkung der Calciumphosphat-Nanopartikel wurde gegenüber humanen mesenchymalen Stammzellen, mononukleären Zellen des peripheren Blutes, *Staphylococcus aureus* und *Escherichia coli* getestet. Silberdotierte Calciumphosphat-Nanopartikel zeigten bei entsprechenden Silberkonzentrationen vergleichbare toxische Eigenschaften wie Silberacetatlösungen. Es konnte gezeigt werden, dass die biologisch wirksamen, d. h. toxischen Konzentrationen, gegenüber hMSCs, PBMCs, *S. aureus* und *E. coli* mit 0,5 bis 5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  im gleichen Bereich liegen. In dieser Studie ließ sich die Notwendigkeit einheitlicher Versuchsbedingungen bei der Ermittlung von biologisch wirksamen Mengen an Silber am Beispiel der eingesetzten Zellnährmedien durch Berechnungen löslicher Silberspezies zeigen. Im Hinblick auf klinische Anwendungen von silberhaltigen Produkten müssen die Expositionszenarien bei der Beurteilung der antibakteriellen Wirkung berücksichtigt werden, damit das umliegende Gewebe nicht geschädigt wird.

Die Zellaufnahme von grün fluoreszierenden CMC-stabilisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln wurde am Beispiel von MG-63-Zellen und hMSCs gezeigt. Die fluoreszierende Carboxymethylcellulose wurde durch kovalente Anbindung von 6-Aminofluorescein über eine Peptidbindung realisiert. Die Nanopartikel werden vermutlich endozytotisch aufgenommen und lassen sich in den Endosomen und Lysosomen der Zellen lokalisieren. Die Menge endozytosierter Calciumphosphat-Nanopartikel hängt von der eingesetzten Konzentration an Nanopartikeln ab. Bei hohen Konzentrationen wird eine Sättigung erreicht, wobei diese Sättigung als Gleichgewicht zwischen Endozytose, lysosomalem Abbau und Exozytose verstanden werden kann. Carboxymethylcellulose-stabilisierte Calciumphosphat-Nanopartikel zeigen gegenüber Chondroitinsulfat-stabilisierten Calciumphos-

phat-Nanopartikeln einen leicht verstärkenden Effekt auf die osteogene Differenzierung von hMSCs in Differenzierungsmedien. Weitere Untersuchungen müssen zeigen, ob die Differenzierung von Stammzellen signifikant beeinflusst werden kann.

In dieser Arbeit wurden darüber hinaus Gold-Nanopartikel synthetisiert und kolloidchemisch charakterisiert. Die Synthesen wurden ausgehend von Tetrachlorogoldsäure mit den Reduktionsmitteln Natriumborhydrid und einem Gemisch aus Trinatriumcitrat und Gerbsäure durchgeführt. Die Nanopartikel wurden mit den Thiol-Liganden Mercaptoethylamin und (*RS*)-Liponsäure sowie dem Polymer Polyvinylpyrrolidon stabilisiert. Die Reduktion mit einem Gemisch aus Trinatriumcitrat und Gerbsäure lieferte reproduzierbar monodisperse Gold-Nanopartikel mit Kerndurchmessern von 5 nm. Die Funktionalisierung mit Mercaptoethylamin führte zu sehr instabilen Dispersionen, wobei die Gold-Nanopartikel innerhalb von wenigen Stunden aggregierten. Mit (*RS*)-Liponsäure und PVP ließen sich negativ geladene Gold-Nanopartikel herstellen und durch Zentrifugation und Redisper-sion in Reinstwasser von überschüssigen Liganden und Ionen befreien. Die Wechselwirkungen der Gold-Nanopartikel mit Proteinen wurden mit Rinderserumalbumin und polyklonalen IgG-Antikörpern aus dem menschlichen Serum untersuchen. Die Anbindung von Antikörpern an die Oberfläche der Gold-Nanopartikel wurde durch Adsorptionsversuche und durch die Kopplung mit 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid und N-Hydroxysuccinimid durchgeführt. Die elektrophoretische Mobilität der Antikörper-Gold-Nanopartikel-Konjugate wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die rein adsorptiven Wechselwirkungen zwischen Antikörpern und Gold-Nanopartikeln mit Antikörper-Gold-Nanopartikel-Konjugaten durch Kopplung mit EDC und NHS vergleichbar sind. Es ließen sich keine Unterschiede im Migrationsverhalten in Agarose-Gelen feststellen. Die starke adsorptive Wechselwirkung zwischen Gold-Nanopartikeln zeigt deutliche Vorteile für die Synthese von Antikörper-Gold-Nanopartikel-Konjugaten, da auf komplizierte kovalente Synthesen verzichtet werden kann.

Die Untersuchungen haben gezeigt, dass die biologische Wirkung von anorganischen Nanopartikeln auf Zellen sehr komplex ist. Auf molekularer Ebene zeigt sich diese Komplexität bei der Charakterisierung der Wechselwirkungen von anorganischen Nanopartikeln mit Proteinen. Im Hinblick auf den Einsatz von Nanopartikeln in der Medizin müssen für einen erfolgreichen therapeutischen Einsatz die Wirkungen sehr genau analysiert werden, um ein Verständnis für die komplexen Zusammenhänge zu bekommen. Nur so können mögliche Risiken durch die Exposition mit Nanopartikeln einschätzen werden. Derzeit fehlen allerdings die Methoden und Strategien, um ein tief gehendes Verständnis dieser Komplexität zu entwickeln. Zukünftige Untersuchungen und neue Strategien werden nötig sein, um das Potential von Nanomaterialien für medizinische Anwendungen auszuschöpfen.

## Literaturverzeichnis

- [1] DIN ISO/TS 80004-1:2010 Nanotechnologien - Fachwörterverzeichnis - Teil 1: Kernbegriffe, Normenausschuss Materialprüfung (NMP), DIN Deutsches Institut für Normung e. V.
- [2] DIN ISO/TS 27687:2010 Nanotechnologien - Terminologie und Begriffe für Nanoobjekte "Nanopartikel, Nanofaser und Nanoplättchen, Normenausschuss Materialprüfung (NMP), DIN Deutsches Institut für Normung e. V.
- [3] G. Oberdörster, E. Oberdörster, J. Oberdörster, *Environ. Health Perspect.*, **2005**, *113*, 823.
- [4] P. Biswas, C. Y. Wu, *J. Air Waste Manag. Assoc.*, **2005**, *55*, 708.
- [5] C. Buzea, I. Pacheco, K. Robbie, *Biointerphases*, **2007**, *2*, MR17.
- [6] I. Freestone, N. Meeks, M. Sax, C. Higgitt, *Gold Bull.*, **2007**, *40*, 270.
- [7] L. Hunt, *Gold Bull.*, **1976**, *9*, 134.
- [8] F. E. Wagner, S. Haslbeck, L. Stievano, S. Calogero, Q. A. Pankhurst, K. P. Martinek, *Nature*, **2000**, *407*, 691.
- [9] D. J. Barber, I. C. Freestone, *Archaeometry*, **2007**, *32*, 33.
- [10] H. Goesmann, C. Feldmann, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2010**, *49*, 1362.
- [11] H. Gleiter, *Prog. Mater. Sci.*, **1989**, *33*, 223.
- [12] G. A. Ozin, *Adv. Mater.*, **1992**, *4*, 612.
- [13] Y. Xia, B. Gates, Y. Yin, Y. Lu, *Adv. Mater.*, **2000**, *12*, 693.
- [14] D. Gatteschi, R. Sessoli, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2003**, *42*, 268.
- [15] X. G. Peng, L. Manna, W. D. Yang, J. Wickham, E. Scher, A. Kadavanich, A. P. Alivisatos, *Nature*, **2000**, *404*, 59.

- [16] Y. Wang, N. Herron, *J. Phys. Chem.*, **1991**, *95*, 525.
- [17] Y. Xia, P. Yang, Y. Sun, Y. Wu, B. Mayers, B. Gates, Y. Yin, F. Kim, H. Yan, *Adv. Mater.*, **2003**, *15*, 353.
- [18] S. Y. Chou, P. R. Krauss, P. J. Renstrom, *Science*, **1996**, *272*, 85.
- [19] H. G. Craighead, *Science*, **2000**, *290*, 1532.
- [20] B. D. Gates, Q. Xu, M. Stewart, D. Ryan, C. G. Willson, G. M. Whitesides, *Chem. Rev.*, **2005**, *105*, 1171.
- [21] G. M. Whitesides, J. P. Mathias, C. T. Seto, *Science*, **1991**, *254*, 1312.
- [22] A. P. Alivisatos, *Science*, **1996**, *271*, 933.
- [23] R. Shenhar, V. M. Rotello, *Acc. Chem. Res.*, **2003**, *36*, 549.
- [24] X. Wang, J. Zhuang, Q. Peng, Y. Li, *Nature*, **2005**, *437*, 121.
- [25] W. Lu, C. M. Lieber, *Nat. Mater.*, **2007**, *6*, 841.
- [26] D. L. Feldheim, K. C. Grabar, M. J. Natan, T. E. Mallouk, *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, *118*, 7640.
- [27] M. R. Ghadiri, J. R. Granja, R. A. Milligan, D. E. McRee, N. Khazanovich, *Nature*, **1993**, *366*, 324.
- [28] M. Reches, E. Gazit, *Science*, **2003**, *300*, 625.
- [29] H. Cui, M. J. Webber, S. I. Stupp, *Biopolymers*, **2010**, *94*, 1.
- [30] C.-L. Chen, N. L. Rosi, *Angew. Chem.*, **2010**, *122*, 2.
- [31] M. Stodulski, T. Gulder, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2012**, *51*, 11202–11204.
- [32] D. R. Nisbet, R. J. Williams, *Biointerphases*, **2012**, *7*, 2.
- [33] A. P. Alivisatos, K. P. Johnsson, X. Peng, T. E. Wilson, C. J. Loweth, M. P. Bruchez, P. G. Schultz, *Nature*, **1996**, *382*, 609.

- 
- [34] R. Drmanac, A. B. Sparks, M. J. Callow, A. L. Halpern, N. L. Burns, B. G. Kermani, P. Carnevali, I. Nazarenko, G. B. Nilsen, G. Yeung, F. Dahl, A. Fernandez, B. Staker, K. P. Pant, J. Baccash, A. P. Borcharding, A. Brownley, R. Cedeno, L. Chen, D. Chernikoff, A. Cheung, R. Chirita, B. Curson, J. C. Ebert, C. R. Hacker, R. Hartlage, B. Hauser, S. Huang, Y. Jiang, V. Karpinchyk, M. Koenig, C. Kong, T. Landers, C. Le, J. Liu, C. E. McBride, M. Morenzoni, R. E. Morey, K. Mutch, H. Perazich, K. Perry, B. A. Peters, J. Peterson, C. L. Pethiyagoda, K. Pothuraju, C. Richter, A. M. Rosenbaum, S. Roy, J. Shafto, U. Sharanhovich, K. W. Shannon, C. G. Sheppy, M. Sun, J. V. Thakuria, A. Tran, D. Vu, A. W. Zaranek, X. Wu, S. Drmanac, A. R. Oliphant, W. C. Banyai, B. Martin, D. G. Ballinger, G. M. Church, C. A. Reid, *Science*, **2010**, 327, 78.
- [35] N. C. Seeman, *Annu. Rev. Biochem.*, **2010**, 79, 65, PMID: 20222824.
- [36] A. Rajendran, M. Endo, H. Sugiyama, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2012**, 51, 874–890.
- [37] T. H. Bayburt, S. G. Sligar, *FEBS Lett.*, **2010**, 584, 1721.
- [38] Y. Liu, K. Li, J. Pan, B. Liu, S.-S. Feng, *Biomaterials*, **2010**, 31, 330.
- [39] P. Pradhan, J. Giri, F. Rieken, C. Koch, O. Mykhaylyk, M. Doeblinger, R. Banerjee, D. Bahadur, C. Plank, *J. Controlled Release*, **2010**, 142, 108.
- [40] D. Lingwood, K. Simons, *Science*, **2010**, 327, 46.
- [41] C. M. Niemeyer, *Angew. Chem.*, **2001**, 113, 4254–4287.
- [42] S. Zhang, *Nat. Biotechnol.*, **2003**, 21, 1171.
- [43] W. Senaratne, L. Andruzzi, C. K. Ober, *Biomacromolecules*, **2005**, 6, 2427.
- [44] J. D. Hartgerink, E. Beniash, S. I. Stupp, *Science*, **2001**, 294, 1684.
- [45] M. Sarikaya, C. Tamerler, A. K. Y. Jen, K. Schulten, F. Baneyx, *Nat. Mater.*, **2003**, 2, 577.
- [46] E. Katz, I. Willner, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2004**, 43, 6042–6108.
- [47] D. F. Williams, *Consensus and definitions in biomaterials*, Band 8 von *Advances in biomaterials*, Elsevier Science Publishers B.V. Amsterdam, **1986**.
- [48] E. Wintermantel, S. Ha, *Medizintechnik*, 5. Auflage, Springer, Berlin Heidelberg, **2009**.

- [49] J. Anderson, A. Rodriguez, D. Chang, *Semin. Immunol.*, **2008**, 20, 86.
- [50] D. Williams, *Biomaterials*, **2008**, 29, 2941.
- [51] D. Williams, *Biomaterials*, **2009**, 30, 5897.
- [52] D. Williams, *Biomaterials*, **2008**, 29, 1737.
- [53] I. Brigger, C. Dubernet, P. Couvreur, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **2002**, 54, 631.
- [54] J. Panyam, V. Labhasetwar, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **2003**, 55, 329.
- [55] N. L. Rosi, C. A. Mirkin, *Chem. Rev.*, **2005**, 105, 1547.
- [56] R. Langer, D. A. Tirrell, *Nature*, **2004**, 428, 487.
- [57] A. E. Nel, L. Maedler, D. Velegol, T. Xia, E. M. V. Hoek, P. Somasundaran, F. Klaessig, V. Castranova, M. Thompson, *Nat. Mater.*, **2009**, 8, 543.
- [58] A. E. Nel, T. Xia, L. Mädler, N. Li, *Science*, **2006**, 311, 622.
- [59] S. J. Klaine, P. J. J. Alvarez, G. E. Batley, T. F. Fernandes, R. D. Handy, D. Y. Lyon, S. Mahendra, M. J. McLaughlin, J. R. Lead, *Environ. Toxicol. Chem.*, **2008**, 27, 1825.
- [60] S. T. Stern, S. E. McNeil, *Toxicol. Sci.*, **2008**, 101, 4.
- [61] N. Lewinski, V. Colvin, R. Drezek, *Small*, **2008**, 4, 26.
- [62] N. J. Walker, J. R. Bucher, *Toxicol. Sci.*, **2009**, 110, 251.
- [63] G. Oberdörster, *J. Intern. Med.*, **2010**, 267, 89.
- [64] E. K. Rushton, J. Jiang, S. S. Leonard, S. Eberly, V. Castranova, P. Biswas, A. Elder, X. Han, R. Gelein, J. Finkelstein, G. Oberdörster, *J. Toxicol. Environ. Health, Part A*, **2010**, 73, 445.
- [65] S. V. Dorozhkin, M. Epple, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2002**, 41, 3130.
- [66] M. Epple, *Biomaterialien und Biomineralisation*, B. G. Teubner Verlag, Wiesbaden, **2003**.
- [67] J. Enax, O. Prymak, D. Raabe, M. Epple, *J. Struct. Biol.*, **2012**, 178, 290.



- [68] P. W. Brown, *J. Am. Ceram. Soc.*, **1992**, 75, 17.
- [69] T. S. B. Narasaraaju, D. E. Phebe, *J. Mater. Sci.*, **1996**, 31, 1.
- [70] V. K. LaMer, R. H. Dinegar, *J. Am. Chem. Soc.*, **1950**, 72, 4847.
- [71] A. Baldan, *J. Mater. Sci.*, **2002**, 37, 2171.
- [72] J. A. Marqusee, J. Ross, *J. Chem. Phys.*, **1984**, 80, 536.
- [73] P. W. Voorhees, *J. Stat. Phys.*, **1985**, 38, 231.
- [74] L. L. Hench, *J. Am. Ceram. Soc.*, **1991**, 74, 1487.
- [75] M. Epple, K. Ganesan, R. Heumann, J. Klesing, A. Kovtun, S. Neumann, V. Sokolova, *J. Mater. Chem.*, **2010**, 20, 18.
- [76] T. Hlabse, A. Walton, *Anal. Chim. Acta*, **1965**, 33, 373.
- [77] A. G. Walton, W. J. Bodin, H. Furedi, A. Schwartz, *Can. J. Chem.*, **1967**, 45, 2695.
- [78] K. Onuma, A. Ito, *Chem. Mater.*, **1998**, 10, 3346.
- [79] G. Toworfe, R. Composto, I. Shapiro, P. Ducheyne, *Biomaterials*, **2006**, 27, 631.
- [80] S. Schweizer, A. Taubert, *Macromol. Biosci.*, **2007**, 7, 1085–1099.
- [81] K. Kandori, T. Kuroda, S. Togashi, E. Katayama, *J. Phys. Chem. B*, **2011**, 115, 653.
- [82] T. Nonoyama, T. Kinoshita, M. Higuchi, K. Nagata, M. Tanaka, K. Sato, K. Kato, *Langmuir*, **2011**, 27, 7077.
- [83] T. Welzel, I. Radtke, W. Meyer-Zaika, R. Heumann, M. Epple, *J. Mater. Chem.*, **2004**, 14, 2213.
- [84] T. Welzel, W. Meyer-Zaika, M. Epple, *Chem. Commun.*, **2004**, 1204.
- [85] H. Füredi-Milhofer, P. Bar-Yosef Ofir, M. Sikirić, N. Garti, *Key Eng. Mat.*, **2004**, 254-256, 11.
- [86] H. Urch, M. Vallet-Regi, L. Ruiz, J. M. Gonzalez-Calbet, M. Epple, *J. Mater. Chem.*, **2009**, 19, 2166.

- [87] M. W. Laschke, K. Witt, T. Pohlemann, M. D. Menger, *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.*, **2007**, 82B, 494–505.
- [88] J. J. Diegmüller, X. Cheng, O. Akkus, *Crystal Growth & Design*, **2009**, 9, 5220.
- [89] F. Graham, A. van der Eb, *Virology*, **1973**, 52, 456.
- [90] C. Chen, H. Okayama, *Mol. Cell. Biol.*, **1987**, 7, 2745.
- [91] M. Jordan, A. Schallhorn, F. M. Wurm, *Nucleic Acids Res.*, **1996**, 24, 596.
- [92] R. M. Izatt, J. J. Christensen, J. H. Rytting, *Chem. Rev.*, **1971**, 71, 439.
- [93] R. Ahmad, H. Arakawa, H. Tajmir-Riahi, *Biophys. J.*, **2003**, 84, 2460.
- [94] V. Sokolova, M. Epple, *Angew. Chem.*, **2008**, 120, 1402.
- [95] G. J. Doherty, H. T. McMahon, *Annu. Rev. Biochem.*, **2009**, 78, 857.
- [96] T.-G. Iversen, T. Skotland, K. Sandvig, *Nano Today*, **2011**, 6, 176.
- [97] I. Canton, G. Battaglia, *Chem. Soc. Rev.*, **2012**, 41, 2718.
- [98] V. V. Sokolova, I. Radtke, R. Heumann, M. Epple, *Biomaterials*, **2006**, 27, 3147.
- [99] V. Sokolova, O. Prymak, W. Meyer-Zaika, H. Cölfen, H. Rehage, A. Shukla, M. Epple, *Materwiss. Werksttech.*, **2006**, 37, 441.
- [100] V. Sokolova, A. Kovtun, O. Prymak, W. Meyer-Zaika, E. A. Kubareva, E. A. Romanova, T. S. Oretskaya, R. Heumann, M. Epple, *J. Mater. Chem.*, **2007**, 17, 721.
- [101] V. Sokolova, A. Kovtun, R. Heumann, M. Epple, *J. Biol. Inorg. Chem.*, **2007**, 12, 174.
- [102] S. Neumann, A. Kovtun, I. D. Dietzel, M. Epple, R. Heumann, *Biomaterials*, **2009**, 30, 6794.
- [103] V. Sokolova, S. Neumann, A. Kovtun, S. Chernousova, R. Heumann, M. Epple, *J. Mater. Sci.*, **2010**, 45, 4952.
- [104] J. Klesing, S. Chernousova, M. Epple, *J. Mater. Chem.*, **2011**, 22, 199.
- [105] V. Sokolova, T. Knuschke, J. Buer, A. Westendorf, M. Epple, *Acta Biomater.*, **2011**, 7, 4029.

- [106] J. Schwiertz, A. Wiehe, S. Gräfe, B. Gitter, M. Epple, *Biomaterials*, **2009**, *30*, 3324.
- [107] J. Klesing, A. Wiehe, B. Gitter, S. Gräfe, M. Epple, *J. Mater. Sci.: Mater. Med.*, **2010**, *21*, 887.
- [108] S. P. Mondejar, A. Kovtun, M. Epple, *J. Mater. Chem.*, **2007**, *17*, 4153.
- [109] M. Neumeier, L. A. Hails, S. A. Davis, S. Mann, M. Epple, *J. Mater. Chem.*, **2011**, *21*, 1250.
- [110] V. Sokolova, M. Epple, *Nanoscale*, **2011**, *3*, 1957.
- [111] H. C. Neu, *Science*, **1992**, *257*, 1064 .
- [112] C. G. Giske, D. L. Monnet, O. Cars, Y. Carmeli, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **2008**, *52*, 813 .
- [113] C. A. Arias, B. E. Murray, *N. Engl. J. Med.*, **2009**, *360*, 439.
- [114] D. M. Livermore, *Int. J. Antimicrob. Agents*, **2012**, *39*, 283.
- [115] C. A. Arias, B. E. Murray, *Nat. Rev. Microbiol.*, **2012**, *10*, 266.
- [116] R. R. Watkins, M. Z. David, R. A. Salata, *J. Med. Microbiol.*, **2012**, *61*, 1179.
- [117] M. Otto, *Cell. Microbiol.*, **2012**, *14*, 1513.
- [118] M. A. Kohanski, D. J. Dwyer, J. J. Collins, *Nat. Rev. Microbiol.*, **2010**, *8*, 423.
- [119] J. Davies, D. Davies, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **2010**, *74*, 417.
- [120] S. B. Levy, B. Marshall, *Nat. Med.*, **2004**, *10*, 122.
- [121] A. I. Hidron, J. R. Edwards, J. Patel, T. C. Horan, D. M. Sievert, D. A. Pollock, S. K. Fridkin, National Healthcare Safety Network Team, Participating National Healthcare Safety Network Facilities, *Infect. Control Hosp. Epidemiol.*, **2008**, *29*, 996.
- [122] A. K. v. d. Bij, J. D. D. Pitout, *J. Antimicrob. Chemother.*, **2012**, *67*, 2090.
- [123] N. Joram, L. d. S. Blanquat, D. Stamm, E. Launay, C. G.-L. Guen, *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, **2012**, *31*, 2481.

- [124] D. M. Sievert, J. T. Rudrik, J. B. Patel, L. C. McDonald, M. J. Wilkins, J. C. Hageman, *Clin. Infect. Dis.*, **2008**, 46, 668.
- [125] S. J. v. Hal, T. P. Lodise, D. L. Paterson, *Clin. Infect. Dis.*, **2012**, 54, 755.
- [126] D. I. Andersson, D. Hughes, *Nat. Rev. Microbiol.*, **2010**, 8, 260.
- [127] L. Fernández, R. E. W. Hancock, *Clin. Microbiol. Rev.*, **2012**, 25, 661.
- [128] C. Costelloe, C. Metcalfe, A. Lovering, D. Mant, A. D. Hay, *BMJ*, **2010**, 340, c2096.
- [129] E. Gullberg, S. Cao, O. G. Berg, C. Ilbäck, L. Sandegren, D. Hughes, D. I. Andersson, *PLoS Pathog.*, **2011**, 7, e1002158.
- [130] J. Davies, K. S. Ryan, *ACS Chem. Biol.*, **2012**, 7, 252.
- [131] A. S. Fauci, D. M. Morens, *N. Engl. J. Med.*, **2012**, 366, 454.
- [132] W. B. Deichmann, D. Henschler, B. Holmstedt, G. Keil, *Arch. Toxicol.*, **1986**, 58, 207.
- [133] H. Klasen, *Burns*, **2000**, 26, 117.
- [134] H. Klasen, *Burns*, **2000**, 26, 131.
- [135] D. W. Brett, *Ostomy. Wound Manage.*, **2006**, 52, 34.
- [136] X. Chen, H. Schluesener, *Toxicol. Lett.*, **2008**, 176, 1.
- [137] J. W. Alexander, *Surg. Infect. (Larchmt)*, **2009**, 10, 289.
- [138] J. Higginbottom, *Prov. Med. Surg. J.*, **1847**, 11, 458.
- [139] Credé, *Arch. Gynecol. Obstet.*, **1881**, 17, 50.
- [140] G. Broughton, J. E. Janis, C. E. Attinger, *Plast. Reconstr. Surg.*, **2006**, 117, 6S.
- [141] K. Boese, *Langenbecks Arch. Surg.*, **1921**, 163, 62.
- [142] J. Wright, K. Lam, R. E. Burrell, *Am. J. Infect. Control*, **1998**, 26, 572.
- [143] M. H. Cavanagh, R. E. Burrell, P. L. Nadworny, *Int. Wound J.*, **2010**, 7, 394.
- [144] K. Dunn, V. Edwards-Jones, *Burns*, **2004**, 30, S1.

- [145] J. M. Schierholz, Z. Wachol-Drewek, L. J. Lucas, G. Pulverer, *Zentralbl. Bakteriол.*, **1998**, 287, 411.
- [146] H. T. Ratte, *Environ. Toxicol. Chem.*, **1999**, 18, 89.
- [147] R. R. Neubig, M. Spedding, T. Kenakin, A. Christopoulos, *Pharmacol. Rev.*, **2003**, 55, 597.
- [148] J. H. Duffus, M. Nordberg, D. M. Templeton, *Pure Appl. Chem.*, **2007**, 79, 1153.
- [149] K. Lohs, P. Elstner, U. Stephan, *Fachlexikon Toxikologie*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, **2008**.
- [150] U.S. EPA., *U.S. Environmental Protection Agency*, **2012**, EPA/600/R-10/081F.
- [151] S. H. Mikkelsen, E. Hansen, T. B. Christensen, *Survey on basic knowledge about exposure and potential environmental and health risks for selected nanomaterials, Technischer Bericht*, Environmental Project - Danish Ministry of the Environment, **2011**.
- [152] E. Project, *Engineered Nanoparticles - Review of Health and Environmental Safety (ENRHES), Technischer Bericht*, European Commission, **2009**.
- [153] S. W. Wijnhoven, W. J. Peijnenburg, C. A. Herberts, W. I. Hagens, A. G. Oomen, E. H. Heugens, B. Roszek, J. Bisschops, I. Gosens, D. Van De Meent, S. Dekkers, W. H. De Jong, M. van Zijverden, A. J. Sips, R. E. Geertsma, *Nanotoxicology*, **2009**, 3, 109.
- [154] S. N. Luoma, *PEN 15 - Silver Nanotechnologies and the Environment, Technischer Bericht*, The Project on Emerging Nanotechnologies, **2008**.
- [155] S. F. Hansen, A. Baun, *Nat. Nanotechnol.*, **2012**, 7, 409.
- [156] M. C. Stensberg, Q. Wei, E. S. McLamore, D. M. Porterfield, A. Wei, M. S. Sepúlveda, *Nanomedicine (Lond.)*, **2011**, 6, 879.
- [157] B. Nowack, H. F. Krug, M. Height, *Environ. Sci. Technol.*, **2011**, 45, 1177.
- [158] I. Chopra, *J. Antimicrob. Chemother.*, **2007**, 59, 587.
- [159] I. Chopra, *J. Antimicrob. Chemother.*, **2007**, 60, 447.
- [160] P. L. Drake, K. J. Hazelwood, *Ann. Occup. Hyg.*, **2005**, 49, 575.

- [161] A. B. G. Lansdown, *Crit. Rev. Toxicol.*, **2007**, *37*, 237.
- [162] J. Farkas, H. Peter, P. Christian, J. A. Gallego Urrea, M. Hassellöv, J. Tuoriniemi, S. Gustafsson, E. Olsson, K. Hylland, K. V. Thomas, *Environ. Int.*, **2011**, *37*, 1057.
- [163] J. Chao, J. Liu, S. Yu, Y. Feng, Z. Tan, R. Liu, Y. Yin, *Anal. Chem.*, **2011**, *83*, 6875.
- [164] H. J. Johnston, G. Hutchison, F. M. Christensen, S. Peters, S. Hankin, V. Stone, *Crit. Rev. Toxicol.*, **2010**, *40*, 328.
- [165] E. Hidalgo, C. Domínguez, *Toxicol. Lett.*, **1998**, *98*, 169.
- [166] C. M. Wood, R. C. Playle, C. Hogstrand, *Environ. Toxicol. Chem.*, **1999**, *18*, 71.
- [167] A. Bianchini, K. C. Bowles, C. J. Brauner, J. W. Gorsuch, J. R. Kramer, C. M. Wood, *Environ. Toxicol. Chem.*, **2002**, *21*, 1294.
- [168] G. Bielmyer, K. Brix, M. Grosell, *Aquat. Toxicol.*, **2008**, *87*, 81.
- [169] A. J. Kennedy, M. S. Hull, A. J. Bednar, J. D. Goss, J. C. Gunter, J. L. Bouldin, P. J. Vikesland, J. A. Steevens, *Environ. Sci. Technol.*, **2010**, *44*, 9571.
- [170] S. Kittler, C. Greulich, J. Gebauer, J. Diendorf, L. Treuel, L. Ruiz, J. Gonzalez-Calbet, M. Vallet-Regi, R. Zellner, M. Köller, M. Epple, *J. Mater. Chem.*, **2010**, *20*, 512.
- [171] M. V. Park, A. M. Neigh, J. P. Vermeulen, L. J. de la Fonteyne, H. W. Verharen, J. J. Briedé, H. van Loveren, W. H. de Jong, *Biomaterials*, **2011**, *32*, 9810.
- [172] L. Braydich-Stolle, S. Hussain, J. J. Schlager, M.-C. Hofmann, *Toxicol. Sci.*, **2005**, *88*, 412.
- [173] C. R. Bowman, F. C. Bailey, M. Elrod-Erickson, A. M. Neigh, R. R. Otter, *Environ. Toxicol. Chem.*, **2012**, *31*, 1793.
- [174] C. E. Albers, W. Hofstetter, K. A. Siebenrock, R. Landmann, F. M. Klenke, *Nanotoxicology*, **2011**, *1*.
- [175] C.-N. Lok, C.-M. Ho, R. Chen, Q.-Y. He, W.-Y. Yu, H. Sun, P. Tam, J.-F. Chiu, C.-M. Che, *J. Biol. Inorg. Chem.*, **2007**, *12*, 527.
- [176] I. Sondi, B. Salopek-Sondi, *J. Colloid Interface Sci.*, **2004**, *275*, 177.

- [177] E. Amato, Y. A. Diaz-Fernandez, A. Taglietti, P. Pallavicini, L. Pasotti, L. Cucca, C. Milanese, P. Grisoli, C. Dacarro, J. M. Fernandez-Hechavarria, V. Necchi, *Langmuir*, **2011**, 27, 9165.
- [178] C. Marambio-Jones, E. Hoek, *J. Nanopart. Res.*, **2010**, 12, 1531.
- [179] X. Jin, M. Li, J. Wang, C. Marambio-Jones, F. Peng, X. Huang, R. Damoiseaux, E. M. V. Hoek, *Environ. Sci. Technol.*, **2010**, 44, 7321.
- [180] M. Ansari, H. Khan, A. Khan, A. Malik, A. Sultan, M. Shahid, F. Shujatullah, A. Azam, *Biol. Med.*, **2011**, 3, 141.
- [181] M. Rai, S. Deshmukh, A. Ingle, A. Gade, *J. Appl. Microbiol.*, **2012**, 112, 841.
- [182] G. A. Martínez-Castañón, N. Niño-Martínez, F. Martínez-Gutierrez, J. R. Martínez-Mendoza, F. Ruiz, *J. Nanopart. Res.*, **2008**, 10, 1343.
- [183] J. Ruparelia, A. Chatterjee, S. Dutttagupta, S. Mukherji, *Acta Biomater.*, **2008**, 4, 707.
- [184] S. Silver, *FEMS Microbiol. Rev.*, **2003**, 27, 341.
- [185] *Official Journal of the European Union*, **2008**, L241, 21.
- [186] M. Shirkhanzadeh, M. Azadegan, *J. Mater. Sci.: Mater. Med.*, **1998**, 9, 385.
- [187] W. Chen, S. Oh, A. Ong, N. Oh, Y. Liu, H. Courtney, M. Appleford, J. Ong, *J. Biomed. Mater. Res. A*, **2007**, 82A, 899.
- [188] M. Díaz, F. Barba, M. Miranda, F. Guitián, R. Torrecillas, J. S. Moya, *J. Nanomater.*, **2009**, 2009, 498505.
- [189] K.-S. Hwang, S. Hwangbo, J.-T. Kim, *J. Nanopart. Res.*, **2008**, 10, 1337.
- [190] Y. Ichikawa, S. Ogata, T. Torimoto, G. Kawachi, K. Kikuta, *J. Ceram. Soc. Jpn.*, **2009**, 117, 294.
- [191] S. Nath, S. Kalmodia, B. Basu, *J. Mater. Sci.: Mater. Med.*, **2010**, 21, 1273.
- [192] N. Rameshbabu, T. S. Kumar, T. Prabhakar, V. Sastry, K. Murty, K. P. Rao, *J. Biomed. Mater. Res. A*, **2007**, 80A, 581.
- [193] S. Sandukas, A. Yamamoto, A. Rabiei, *J. Biomed. Mater. Res. A*, **2011**, 97A, 490.

- [194] M. Roy, G. A. Fielding, H. Beyenal, A. Bandyopadhyay, S. Bose, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **2012**, 4, 1341.
- [195] V. Simon, C. Albon, S. Simon, *J. Non-Cryst. Solids*, **2008**, 354, 1751.
- [196] C. Ciobanu, F. Massuyeau, L. Constantin, D. Predoi, *Nanoscale Res. Lett.*, **2011**, 6, 613.
- [197] M.-C. Daniel, D. Astruc, *Chem. Rev.*, **2004**, 104, 293.
- [198] M. Faraday, *Phil. Trans. R. Soc.*, **1857**, 147, 145.
- [199] L. Vanino, *J. Prakt. Chem.*, **1906**, 73, 575–576.
- [200] W. R. Newman, L. M. Principe, *Early Sci. Med.*, **1998**, 3, 32.
- [201] M. Knoll, E. Ruska, *Z. Phys. A Hadron. Nucl.*, **1932**, 78, 318.
- [202] Z. L. Wang, *J. Phys. Chem. B*, **2000**, 104, 1153.
- [203] H. Bönemann, R. M. Richards, *Eur. J. Inorg. Chem.*, **2001**, 2001, 2455–2480.
- [204] G. Schmid, *Chem. Rev.*, **1992**, 92, 1709.
- [205] J. Turkevich, P. C. Stevenson, J. Hillier, *Discuss. Faraday Soc.*, **1951**, 11, 55.
- [206] J. Turkevich, *Gold Bull.*, **1985**, 18, 86.
- [207] M. Brust, M. Walker, D. Bethell, D. J. Schiffrin, R. Whyman, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, **1994**, 801.
- [208] M. Brust, J. Fink, D. Bethell, D. J. Schiffrin, C. Kiely, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, **1995**, 1655.
- [209] G. Frens, *Nature*, **1973**, 241, 20.
- [210] Y. Sun, Y. Xia, *Science*, **2002**, 298, 2176.
- [211] M.-P. Pileni, *Nat. Mater.*, **2003**, 2, 145.
- [212] B. Nikoobakht, M. A. El-Sayed, *Chem. Mater.*, **2003**, 15, 1957.
- [213] C. Murphy, N. Jana, *Adv. Mater.*, **2002**, 14, 80–82.
- [214] N. R. Jana, L. Gearheart, C. J. Murphy, *J. Phys. Chem. B*, **2001**, 105, 4065.



- [215] Y. Xia, Y. Xiong, B. Lim, S. E. Skrabalak, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2009**, 48, 60–103.
- [216] D. Mahl, *Synthese, Löslichkeit und Stabilität von Gold-Nanopartikeln in biologischen Medien*, Dissertation, Universität Duisburg-Essen, **2011**.
- [217] T. Laaksonen, P. Ahonen, C. Johans, K. Kontturi, *ChemPhysChem*, **2006**, 7, 2143–2149.
- [218] K. Saha, S. S. Agasti, C. Kim, X. Li, V. M. Rotello, *Chem. Rev.*, **2012**, 112, 2739.
- [219] W. Faulk, G. Taylor, *Immunochemistry*, **1971**, 8, 1081.
- [220] C. J. Murphy, A. M. Gole, J. W. Stone, P. N. Sisco, A. M. Alkilany, E. C. Goldsmith, S. C. Baxter, *Acc. Chem. Res.*, **2008**, 41, 1721.
- [221] W. D. Geoghegan, G. A. Ackerman, *J. Histochem. Cytochem.*, **1977**, 25, 1187.
- [222] C. S. Holgate, P. Jackson, P. N. Cowen, C. C. Bird, *J. Histochem. Cytochem.*, **1983**, 31, 938.
- [223] L. M. Demers, C. A. Mirkin, R. C. Mucic, R. A. Reynolds, R. L. Letsinger, R. Elgharian, G. Viswanadham, *Anal. Chem.*, **2000**, 72, 5535.
- [224] L. Hao, P. C. Patel, A. H. Alhasan, D. A. Giljohann, C. A. Mirkin, *Small*, **2011**, 7, 3158.
- [225] A. Hofmann, P. Schmiel, B. Stein, C. Graf, *Langmuir*, **2011**, 27, 15165.
- [226] C. A. Mirkin, *MRS Bulletin*, **2010**, 35, 532.
- [227] L. M. Weiner, R. Surana, S. Wang, *Nat. Rev. Immunol.*, **2010**, 10, 317.
- [228] I. H. El-Sayed, X. Huang, M. A. El-Sayed, *Nano Lett.*, **2005**, 5, 829.
- [229] X. Huang, I. H. El-Sayed, W. Qian, M. A. El-Sayed, *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, 128, 2115.
- [230] D. A. Giljohann, D. S. Seferos, W. L. Daniel, M. D. Massich, P. C. Patel, C. A. Mirkin, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2010**, 49, 3280.
- [231] E. Gullotti, Y. Yeo, *Mol. Pharm.*, **2009**, 6, 1041.
- [232] G. T. Hermanson, *Bioconjugate Techniques, Second Edition*, 2. Auflage, Academic Press, **2008**.

- [233] M. J. Schwuger, *Lehrbuch der Grenzflächenchemie*, Thieme, **1996**.
- [234] B. Derjaguin, L. Landau, *Prog. Surf. Sci.*, **1993**, 43, 30.
- [235] E. J. W. Verwey, *J. Phys. Chem.*, **1947**, 51, 631.
- [236] M. Boström, W. Kunz, B. W. Ninham, *Langmuir*, **2005**, 21, 2619.
- [237] J. Heuvingh, M. Zappa, A. Fery, *Langmuir*, **2005**, 21, 3165.
- [238] J. N. Israelachvili, R. M. Pashley, *Nature*, **1983**, 306, 249.
- [239] L. J. Douglas, M. Lupkowski, T. L. Dodd, F. van Swol, *Langmuir*, **1993**, 9, 1442.
- [240] J. A. Molina-Bolívar, J. L. Ortega-Vinuesa, *Langmuir*, **1999**, 15, 2644.
- [241] J. Lyklema, *Adv. Colloid Interface Sci.*, **2003**, 100, 1.
- [242] T. F. Tadros, *Colloid stability*, Band 1, WILEY-VCH, Weinheim, **2007**.
- [243] H.-D. Dörfler, *Grenzflächen und kolloid-disperse Systeme*, Springer, Berlin Heidelberg, **2002**.
- [244] T. F. Tadros, *Colloids in Cosmetics and Personal Care*, Band 4, WILEY-VCH, Weinheim, **2007**.
- [245] P. J. Flory, W. R. Krigbaum, *J. Chem. Phys.*, **1950**, 18, 1086.
- [246] E. Fischer, *Colloid Polym. Sci.*, **1958**, 160, 120.
- [247] R. Evans, D. Napper, *Colloid Polym. Sci.*, **1973**, 251, 409.
- [248] R. Evans, D. H. Napper, *Colloid Polym. Sci.*, **1973**, 251, 329.
- [249] J. E. Seebergh, J. C. Berg, *Langmuir*, **1994**, 10, 454.
- [250] G. Fritz, V. Schädler, N. Willenbacher, N. J. Wagner, *Langmuir*, **2002**, 18, 6381.
- [251] R. Evans, J. B. Smitham, D. H. Napper, *Colloid Polym. Sci.*, **1977**, 255, 161.
- [252] G. S. Manning, *Biophys. Chem.*, **1977**, 7, 95.
- [253] G. S. Manning, *Acc. Chem. Res.*, **1979**, 12, 443.
- [254] S. Baeurle, M. Kiselev, E. Makarova, E. Nogovitsin, *Polymer*, **2009**, 50, 1805.

- [255] W. Brown, D. Henley, *Macromol. Chem. Phys.*, **1964**, 79, 68.
- [256] C. W. Hoogendam, A. de Keizer, M. A. Cohen Stuart, B. H. Bijsterbosch, J. A. M. Smit, J. A. P. P. van Dijk, P. M. van der Horst, J. G. Batelaan, *Macromolecules*, **1998**, 31, 6297.
- [257] M. Bathe, G. C. Rutledge, A. J. Grodzinsky, B. Tidor, *Biophys. J.*, **2005**, 89, 2357.
- [258] H. Thielking, M. Schmidt, *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, WILEY-VCH, Weinheim, **2006**.
- [259] D. Klemm, B. Heublein, H. Fink, A. Bohn, *Angew. Chem.*, **2005**, 117, 3422.
- [260] T. Heinze, T. Liebert, *Prog. Polym. Sci.*, **2001**, 26, 1689.
- [261] T. Heinze, A. Koschella, *Macromol. Symp.*, **2005**, 223, 13.
- [262] S. J. Farber, M. Schubert, *J. Clin. Invest.*, **1957**, 36, 1715.
- [263] A. I. Caplan, *J. Orthop. Res.*, **1991**, 9, 641.
- [264] E. Ruoslahti, *Annu. Rev. Cell Biol.*, **1988**, 4, 229.
- [265] W. D. Comper, T. C. Laurent, *Physiol. Rev.*, **1978**, 58, 255.
- [266] D. McNicol, P. J. Roughley, *Biochem. J.*, **1980**, 185, 705.
- [267] H. Claassen, J. Werner, *J. Anat.*, **2004**, 205, 371–380.
- [268] E. Ruoslahti, Y. Yamaguchi, *Cell*, **1991**, 64, 867.
- [269] K. R. Taylor, R. L. Gallo, *FASEB J.*, **2006**, 20, 9.
- [270] H. G. Khorana, *Chem. Rev.*, **1953**, 53, 145.
- [271] D. G. Hoare, D. E. Koshland Jr, *J. Biol. Chem.*, **1967**, 242, 2447.
- [272] A. Williams, I. T. Ibrahim, *Chem. Rev.*, **1981**, 81, 589.
- [273] M. A. Gilles, A. Q. Hudson, C. L. Borders, *Anal. Biochem.*, **1990**, 184, 244.
- [274] D. Sehgal, I. Vijay, *Anal. Biochem.*, **1994**, 218, 87.
- [275] N. Nakajima, Y. Ikada, *Bioconjugate Chem.*, **1995**, 6, 123.

- [276] S. Nozaki, *J. Pept. Res.*, **1999**, 54, 162.
- [277] Y. J. Pu, R. K. Vaid, S. K. Boini, R. W. Towsley, C. W. Doecke, D. Mitchell, *Org. Process Res. Dev.*, **2008**, 13, 310.
- [278] L. C. Chan, B. G. Cox, *J. Org. Chem.*, **2007**, 72, 8863.
- [279] Z. Grabarek, J. Gergely, *Anal. Biochem.*, **1990**, 185, 131.
- [280] F. Albericio, J. M. Bofill, A. El-Faham, S. A. Kates, *J. Org. Chem.*, **1998**, 63, 9678.
- [281] M. Beyermann, P. Henklein, A. Klose, R. Sohr, M. Bienert, *J. Pept. Res.*, **1991**, 37, 252.
- [282] M. F. Pittenger, A. M. Mackay, S. C. Beck, R. K. Jaiswal, R. Douglas, J. D. Mosca, M. A. Moorman, D. W. Simonetti, S. Craig, D. R. Marshak, *Science*, **1999**, 284, 143.
- [283] R. J. Deans, A. B. Moseley, *Exp. Hematol.*, **2000**, 28, 875.
- [284] A. R. Williams, J. M. Hare, *Circ. Res.*, **2011**, 109, 923.
- [285] A. I. Caplan, S. P. Bruder, *Trends Mol. Med.*, **2001**, 7, 259.
- [286] S. P. Bruder, D. J. Fink, A. I. Caplan, *J. Cell. Biochem.*, **1994**, 56, 283.
- [287] A. G. Robling, A. B. Castillo, C. H. Turner, *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, **2006**, 8, 455.
- [288] J. Tolar, K. Le Blanc, A. Keating, B. R. Blazar, *STEM CELLS*, **2010**, 28, 1446.
- [289] P. Charbord, *Hum. Gene Ther.*, **2010**, 21, 1045.
- [290] L. C. Gerstenfeld, D. M. Cullinane, G. L. Barnes, D. T. Graves, T. A. Einhorn, *J. Cell. Biochem.*, **2003**, 88, 873.
- [291] J. M. Kanczler, R. O. Oreffo, *Eur. Cell Mater.*, **2008**, 15, 100.
- [292] N. G. Singer, A. I. Caplan, *Annu. Rev. Pathol.*, **2011**, 6, 457.
- [293] F. Dazzi, L. Lopes, L. Weng, *Immunology*, **2012**, 137, 206.
- [294] H. G. R. Gradinger, *Ossäre Integration*, Springer Medizin Verlag, Heidelberg, **2006**.

- [295] S. C. Manolagas, R. L. Jilka, *N. Engl. J. Med.*, **1995**, 332, 305.
- [296] D. Puppi, F. Chiellini, A. Piras, E. Chiellini, *Prog. Polym. Sci.*, **2010**, 35, 403.
- [297] A. Bedi, B. T. Feeley, I. Williams, *J. Bone Joint Surg. Am.*, **2010**, 92, 994.
- [298] A. Tautzenberger, A. Kovtun, A. Ignatius, *Int. J. Nanomedicine*, **2012**, 7, 4545.
- [299] A. Braun, O. Couteau, K. Franks, V. Kestens, G. Roebben, A. Lamberty, T. Linsinger, *Adv. Powder Technol.*, **2011**, 22, 766.
- [300] D. J. Scott, S. E. Harding, A. J. Rowe, *Analytical Ultracentrifugation*, The Royal Society of Chemistry, **2005**.
- [301] T. Detloff, T. Sobisch, D. Lerche, *Part. Part. Syst. Char.*, **2006**, 23, 184.
- [302] T. J. Johnson, E. Davis, *J. Colloid Interface Sci.*, **1999**, 215, 397.
- [303] X. Xu, K. K. Caswell, E. Tucker, S. Kabisatpathy, K. L. Brodhacker, W. A. Scrivens, *J. Chromatogr. A*, **2007**, 1167, 35.
- [304] M. Hanauer, S. Pierrat, I. Zins, A. Lotz, C. Sönnichsen, *Nano Lett.*, **2007**, 7, 2881.
- [305] R. B. Schoch, J. Han, P. Renaud, *Rev. Mod. Phys.*, **2008**, 80, 839.
- [306] DIN ISO 13321 Partikelgrößenanalyse - Photonenkorrelationsspektroskopie.
- [307] W. Schärtl, *Light Scattering from Polymer Solutions and Nanoparticle Dispersions*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, **2007**.
- [308] W. F. Hemminger, *Methoden der Thermischen Analyse*, Springer, Berlin Heidelberg, **1989**.
- [309] M. Hesse, *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*, Thieme, Stuttgart, New York, **2002**.
- [310] M. H. Gey, *Instrumentelle Analytik und Bioanalytik*, 2., überarbeitete und erweiterte Auflage, Springer, Berlin Heidelberg, **2008**.
- [311] J. S. Pedersen, *Adv. Colloid Interface Sci.*, **1997**, 70, 171.
- [312] J. Polte, T. T. Ahner, F. Delissen, S. Sokolov, F. Emmerling, A. F. Thünemann, R. Kraehnert, *J. Am. Chem. Soc.*, **2010**, 132, 1296.

- [313] J. D. Allison, D. S. Brown, K. J. Novo-Gradac, *MINTEQA2/PRODEFA2, A Geochemical Assessment Model for Environmental Systems*., U.S. Environmental Protection Agency National Exposure Research Laboratory Ecosystems Research Division Athens, Georgia, **1998**.
- [314] C. W. Davies, *J. Chem. Soc.*, **1938**, 2093.
- [315] J. P. Gustafsson, <http://www2.lwr.kth.se/English/OurSoftware/vminteq/index.html>, Visual MINTEQ ver. 3.0, **2012**.
- [316] L. Liu, R. Hurt, *Environ. Sci. Technol.*, **2010**, *44*, 2169.
- [317] R. D. Kent, P. J. Vikesland, *Environ. Sci. Technol.*, **2012**, *46*, 6977.
- [318] B. P. Jackson, D. Bugge, J. F. Ranville, C. Y. Chen, *Environ. Sci. Technol.*, **2012**, *46*, 5550.
- [319] M. N. Hughes, R. K. Poole, *Microbiology*, **1991**, *137*, 725.
- [320] Y. Ogushi, S. Sakai, K. Kawakami, *J. Biosci. Bioeng.*, **2007**, *104*, 30.
- [321] T. Mohan, R. Kargl, S. Köstler, A. Doliska, G. Findenig, V. Ribitsch, K. Stana-Kleinschek, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **2012**, *4*, 2743.
- [322] Y. Li, A. E. Martell, *Inorg. Chim. Acta*, **1995**, *231*, 159.
- [323] M. Wirde, U. Gelius, L. Nyholm, *Langmuir*, **1999**, *15*, 6370.
- [324] J. Zhang, A. Bilic, J. R. Reimers, N. S. Hush, J. Ulstrup, *J. Phys. Chem. B*, **2005**, *109*, 15355.
- [325] D. V. Leff, L. Brandt, J. R. Heath, *Langmuir*, **1996**, *12*, 4723.
- [326] J. C. Love, L. A. Estroff, J. K. Kriebel, R. G. Nuzzo, G. M. Whitesides, *Chem. Rev.*, **2005**, *105*, 1103.
- [327] E. Pensa, E. Cortés, G. Corthey, P. Carro, C. Vericat, M. H. Fonticelli, G. Benítez, A. A. Rubert, R. C. Salvarezza, *Acc. Chem. Res.*, **2012**, *45*, 1183.
- [328] H. A. Biebuyck, C. D. Bain, G. M. Whitesides, *Langmuir*, **1994**, *10*, 1825.
- [329] K. Heister, D. L. Allara, K. Bahnck, S. Frey, M. Zharnikov, M. Grunze, *Langmuir*, **1999**, *15*, 5440.

- [330] C. W. Hogue, *Trends Biochem. Sci.*, **1997**, 22, 314.
- [331] B. Vogelman, W. A. Craig, *The Journal of Pediatrics*, **1986**, 108, 835.
- [332] J. M. Andrews, *J. Antimicrob. Chemother.*, **2001**, 48, 5.
- [333] J. Brody, P. Yager, R. Goldstein, R. Austin, *Biophys. J.*, **1996**, 71, 3430.
- [334] J. Kestin, M. Sokolov, W. A. Wakeham, *J. Phys. Chem. Ref. Data*, **1978**, 7, 941.
- [335] W. C. Jackson, F. Kuckuck, B. Edwards, A. Mammoli, C. Gallegos, G. Lopez, T. Buranda, L. Sklar, *Cytometry*, **2002**, 47, 183.
- [336] R. A. Truesdell, P. V. Vorobieff, L. A. Sklar, A. A. Mammoli, *Phys. Rev. E*, **2003**, 67, 066304.
- [337] R. A. Truesdell, J. W. Bartsch, T. Buranda, L. A. Sklar, A. A. Mammoli, *Exp. Fluids*, **2005**, 39, 819.
- [338] T. Heinze, D. Klemm, F. Loth, I. Nehls, *Angew. Makromol. Chem.*, **1990**, 178, 95–107.
- [339] W.-M. Kulicke, C. Clasen, C. Lohman, *Macromol. Symp.*, **2005**, 223, 151–174.
- [340] W. Kulicke, A. H. Kull, W. Kull, H. Thielking, J. Engelhardt, J. Pannek, *Polymer*, **1996**, 37, 2723.
- [341] L. A. Parolis, R. van der Merwe, G. V. Groenmeyer, P. J. Harris, *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.*, **2008**, 317, 109.
- [342] U. Kästner, H. Hoffmann, R. Dönges, J. Hilbig, *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.*, **1997**, 123, 307.
- [343] T. Heinze, D. Klemm, F. Loth, I. Nehls, *Angew. Makromol. Chem.*, **1990**, 178, 95.
- [344] E. Seyrek, J. Hierrezuelo, A. Sadeghpour, I. Szilagyi, M. Borkovec, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2011**, 13, 12716.
- [345] J. Wang, P. Somasundaran, *J. Colloid Interface Sci.*, **2005**, 291, 75.
- [346] C. W. Hoogendam, A. de Keizer, M. A. Cohen Stuart, B. H. Bijsterbosch, J. G. Batelaan, P. M. van der Horst, *Langmuir*, **1998**, 14, 3825.

- [347] C. Hoogendam, J. Peters, R. Tuinier, A. de Keizer, M. Cohen Stuart, B. Bijsterbosch, *J. Colloid Interface Sci.*, **1998**, 207, 309.
- [348] T. Phenrat, N. Saleh, K. Sirk, H. Kim, R. D. Tilton, G. V. Lowry, *J. Nanopart. Res.*, **2008**, 10, 795.
- [349] R. R. Netz, D. Andelman, *Phys. Rep.*, **2003**, 380, 1.
- [350] K. Kamburova, T. Radeva, *J. Colloid Interface Sci.*, **2007**, 313, 398.
- [351] E. I. F. Pearce, *Calcif. Tissue Int.*, **1981**, 33, 395.
- [352] K. Sudarsanan, R. A. Young, *Acta Crystallogr. B*, **1969**, 25, 1534.
- [353] B. O. Fowler, M. Markovic, W. E. Brown, *Chem. Mater.*, **1993**, 5, 1417.
- [354] S. Gadaleta, E. Paschalis, F. Betts, R. Mendelsohn, A. Boskey, *Calcif. Tissue Int.*, **1996**, 58, 9.
- [355] J. Schurz, E. Kienzl, *Monatsh. Chem.*, **1958**, 88, 1017.
- [356] T. Heinze, K. Pfeiffer, *Angew. Makromol. Chem.*, **1999**, 266, 37.
- [357] R. C. Murdock, L. Braydich-Stolle, A. M. Schrand, J. J. Schlager, S. M. Hussain, *Toxicol. Sci.*, **2008**, 101, 239.
- [358] E. A. Peterson, H. A. Sober, *J. Am. Chem. Soc.*, **1956**, 78, 751.
- [359] I. Kagawa, M. Nagasawa, *J. Polym. Sci.*, **1955**, 16, 299–310.
- [360] I. Kagawa, K. Katsuura, *J. Polym. Sci.*, **1955**, 17, 365–374.
- [361] S. Kapoor, C. Gopinathan, *Radiat. Phys. Chem.*, **1997**, 49, 51.
- [362] B. Y. Spivakov, K. Geckeler, E. Bayer, *Nature*, **1985**, 315, 313.
- [363] B. L. Rivas, E. D. Pereira, I. Moreno-Villoslada, *Prog. Polym. Sci.*, **2003**, 28, 173.
- [364] P. F. Derr, R. M. Stockdale, W. C. Vosburgh, *J. Am. Chem. Soc.*, **1941**, 63, 2670.
- [365] B. S. Fox, M. K. Beyer, V. E. Bondybey, *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, 124, 13613.
- [366] W. Boos, U. Ehmann, H. Forkl, W. Klein, M. Rimmele, P. Postma, *J. Bacteriol.*, **1990**, 172, 3450.



- [367] J. H. Crowe, L. M. Crowe, D. Chapman, *Science*, **1984**, 223, 701.
- [368] A. D. Elbein, Y. Pan, I. Pastuszak, D. Carroll, *Glycobiology*, **2003**, 13, 17R .
- [369] S. L. Gordon, S. R. Oppenheimer, A. M. Mackay, J. Brunnabend, I. Puhlev, F. Levine, *Cryobiology*, **2001**, 43, 182.
- [370] S. B. Leslie, E. Israeli, B. Lighthart, J. H. Crowe, L. M. Crowe, *Appl. Environ. Microbiol.*, **1995**, 61, 3592.
- [371] A. S. Rudolph, J. H. Crowe, L. M. Crowe, *Arch. Biochem. Biophys.*, **1986**, 245, 134.
- [372] J. G. Sampedro, S. Uribe, *Mol. Cell. Biochem.*, **2004**, 256, 319.
- [373] G. Strauss, P. Schurtenberger, H. Hauser, *Biochim. Biophys. Acta*, **1986**, 858, 169.
- [374] A. R. Strom, I. Kaasen, *Mol. Microbiol.*, **1993**, 8, 205.
- [375] D. T. Welsh, R. A. Herbert, *FEMS Microbiol. Lett.*, **1999**, 174, 57.
- [376] S. Ohtake, Y. J. Wang, *J. Pharm. Sci.*, **2011**, 100, 2020.
- [377] L. Crowe, D. Reid, J. Crowe, *Biophys. J.*, **1996**, 71, 2087.
- [378] K. Oku, M. Kurose, M. Kubota, S. Fukuda, M. Kurimoto, Y. Tujisaka, M. Sakurai, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **2005**, 69, 7.
- [379] P. Mehl, *J. Therm. Anal. Calorim.*, **1997**, 49, 817.
- [380] T. Chen, A. Fowler, M. Toner, *Cryobiology*, **2000**, 40, 277.
- [381] X. Li, J. J. Lenhart, *Environ. Sci. Technol.*, **2012**, 46, 5378.
- [382] X. Jin, M. Li, J. Wang, C. Marambio-Jones, F. Peng, X. Huang, R. Damoiseaux, E. M. V. Hoek, *Environ. Sci. Technol.*, **2010**, 44, 7321.
- [383] J. M. Unrine, B. P. Colman, A. J. Bone, A. P. Gondikas, C. W. Matson, *Environ. Sci. Technol.*, **2012**, 46, 6915.
- [384] R. Ma, C. Levard, S. M. Marinakos, Y. Cheng, J. Liu, F. M. Michel, G. E. Brown, G. V. Lowry, *Environ. Sci. Technol.*, **2012**, 46, 752.
- [385] S. V. Dorozhkin, *Acta Biomater.*, **2010**, 6, 715.

- [386] F. Rypacek, J. Drobnik, J. Kalal, *Anal. Biochem.*, **1980**, *104*, 141.
- [387] C. Boga, S. Puggioli, M. Gherpelli, G. Farruggia, E. Pagnotta, L. Masotti, P. Neyroz, *Anal. Biochem.*, **2004**, *335*, 196.
- [388] V. Uryga-Polowy, D. Kosslick, C. Freund, J. Rademann, *ChemBioChem*, **2008**, *9*, 2452.
- [389] Y. Shchipunov, O. Khlebnikov, *Colloid J.*, **2011**, *73*, 418.
- [390] H. Dautzenberg, B. Lukanoff, H.-G. Hicke, *Acta Polym.*, **1990**, *41*, 233–243.
- [391] G. Bertani, *J. Bacteriol.*, **1951**, *62*, 293.
- [392] H. Tao, C. Bausch, C. Richmond, F. R. Blattner, T. Conway, *J. Bacteriol.*, **1999**, *181*, 6425.
- [393] J. Shiloach, R. Fass, *Biotechnol. Adv.*, **2005**, *23*, 345.
- [394] M. Baev, D. Baev, A. Radek, J. Campbell, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **2006**, *71*, 310.
- [395] M. Baev, D. Baev, A. Radek, J. Campbell, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **2006**, *71*, 323.
- [396] M. Baev, D. Baev, A. Jansco Radek, J. Campbell, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **2006**, *71*, 317.
- [397] S. Selvarasu, D. S.-W. Ow, S. Y. Lee, M. M. Lee, S. K.-W. Oh, I. A. Karimi, D.-Y. Lee, *Biotechnol. Bioeng.*, **2009**, *102*, 923–934.
- [398] G. Sezonov, D. Joseleau-Petit, R. D'Ari, *J. Bacteriol.*, **2007**, *189*, 8746.
- [399] J. Zhang, J. Reddy, B. Buckland, R. Greasham, *Biotechnol. Bioeng.*, **2003**, *82*, 640–652.
- [400] M. Peleg, M. G. Corradini, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **2011**, *51*, 917.
- [401] S. V. Ambudkar, G. W. Zlotnick, B. P. Rosen, *J. Biol. Chem.*, **1984**, *259*, 6142.
- [402] P. Gangola, B. P. Rosen, *J. Biol. Chem.*, **1987**, *262*, 12570.

- [403] S. Casaregola, M. Chen, N. Bouquin, V. Norris, A. Jacq, M. Goldberg, S. Margaron, M. Tempete, S. Mckenna, H. Sweetman, S. Bernard, G. Mc Gurk, S. Seror, I. Holland, *Res. Microbiol.*, **1991**, 142, 201.
- [404] S. B. Levy, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1992**, 36, 695.
- [405] V. L. Thomas, B. A. Sanford, M. A. Ramsay, *Microbiology*, **1993**, 139, 623.
- [406] V. Norris, S. Grant, P. Freestone, J. Canvin, F. N. Sheikh, I. Toth, M. Trinei, K. Modha, R. I. Norman, *J. Bacteriol.*, **1996**, 178, 3677, PMID: 8682765 PMCID: PMC178146.
- [407] J. Michiels, C. Xi, J. Verhaert, J. Vanderleyden, *Trends Microbiol.*, **2002**, 10, 87.
- [408] D. C. Dominguez, *Mol. Microbiol.*, **2004**, 54, 291–297.
- [409] A. Martins, L. Machado, S. Costa, P. Cerca, G. Spengler, M. Viveiros, L. Amaral, *Int. J. Antimicrob. Agents*, **2011**, 37, 410.
- [410] M. Ramstedt, B. Ekstrand-Hammarström, A. V. Shchukarev, A. Bucht, L. Österlund, M. Welch, W. T. Huck, *Biomaterials*, **2009**, 30, 1524.
- [411] A. Peetsch, C. Greulich, D. Braun, C. Stroetges, H. Rehage, B. Siebers, M. Köller, M. Epple, *Colloids Surf. B Biointerfaces*, **2013**, 102, 724.
- [412] O. Choi, K. K. Deng, N.-J. Kim, L. Ross, R. Y. Surampalli, Z. Hu, *Water Res.*, **2008**, 42, 3066.
- [413] H.-L. Liu, S. A. Dai, K.-Y. Fu, S.-h. Hsu, *Int. J. Nanomed.*, **2010**, 5, 1017.
- [414] C.-N. Lok, C.-M. Ho, R. Chen, Q.-Y. He, W.-Y. Yu, H. Sun, P. K.-H. Tam, J.-F. Chiu, C.-M. Che, *J. Proteome Res.*, **2006**, 5, 916.
- [415] A. Panacek, L. Kvitek, R. Prucek, M. Kolar, R. Vecerova, N. Pizurova, T. Sharma, Virender K. and Nevecna, R. Zboril, *J. Phys. Chem. B*, **2006**, 110, 16248.
- [416] G. Zhao, S. E. Stevens, *BioMetals*, **1998**, 11, 27.
- [417] S. A. Weston, C. R. Parish, *J. Immunol. Methods*, **1990**, 133, 87.
- [418] C. Greulich, S. Kittler, M. Epple, G. Muhr, M. Köller, *Langenbecks Arch. Surg.*, **2009**, 394, 495.

- [419] C. Greulich, J. Diendorf, J. GeÄŸmann, T. Simon, T. Habijan, G. Eggeler, T. Schildhauer, M. Epple, M. Köller, *Acta Biomater.*, **2011**, 7, 3505.
- [420] C. Beer, R. Foldbjerg, Y. Hayashi, D. S. Sutherland, H. Autrup, *Toxicol. Lett.*, **2012**, 208, 286.
- [421] C. Greulich, J. Diendorf, T. Simon, G. Eggeler, M. Epple, M. Köller, *Acta Biomater.*, **2011**, 7, 347.
- [422] DIN EN ISO 20776-1 Labormedizinische Untersuchungen und In-vitro-Diagnostika-Systeme - Empfindlichkeitsprüfung von Infektionserregern und Evaluation von Geräten zur antimikrobiellen Empfindlichkeitsprüfung - Teil 1.
- [423] DIN EN ISO 20776-2 Labormedizinische Untersuchungen und In-vitro-Diagnostika-Systeme - Empfindlichkeitsprüfung von Infektionserregern und Evaluation von Geräten zur antimikrobiellen Empfindlichkeitsprüfung - Teil 2.
- [424] L. B. Reller, M. Weinstein, J. H. Jorgensen, M. J. Ferraro, *Clin. Infect. Dis.*, **2009**, 49, 1749.
- [425] M.-L. T. Lee, G. A. Whitmore, *Biometrics*, **1999**, 55, 1215–1220.
- [426] R. Lambert, J. Pearson, *J. Appl. Microbiol.*, **2000**, 88, 784–790.
- [427] G. Kahlmeter, D. F. J. Brown, F. W. Goldstein, A. P. MacGowan, J. W. Mouton, A. Österlund, A. Rodloff, M. Steinbakk, P. Urbaskova, A. Vatopoulos, *J. Antimicrob. Chemother.*, **2003**, 52, 145.
- [428] R. Lambert, R. Lambert, *J. Appl. Microbiol.*, **2006**, 100, 999–1010.
- [429] G. Oberdörster, A. Maynard, K. Donaldson, V. Castranova, J. Fitzpatrick, K. Ausman, J. Carter, B. Karn, W. Kreyling, D. Lai, S. Olin, N. Monteiro-Riviere, D. Warheit, H. Yang, *Part. Fibre Toxicol.*, **2005**, 2, 8.
- [430] S. Arora, J. M. Rajwade, K. M. Paknikar, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **2012**, 258, 151.
- [431] W. Zhang, Y. Yao, N. Sullivan, Y. Chen, *Environ. Sci. Technol.*, **2011**, 45, 4422.
- [432] H. Bouwmeester, J. Poortman, R. J. Peters, E. Wijma, E. Kramer, S. Makama, K. Puspitaninganindita, H. J. P. Marvin, A. A. C. M. Peijnenburg, P. J. M. Hendriksen, *ACS Nano*, **2011**, 5, 4091.

- [433] Z. Xiu, Q. Zhang, H. L. Puppala, V. L. Colvin, P. J. J. Alvarez, *Nano Lett.*, **2012**, 12, 4271.
- [434] Q. L. Feng, J. Wu, G. Q. Chen, F. Z. Cui, T. N. Kim, J. O. Kim, *J. Biomed. Mater. Res.*, **2000**, 52, 662.
- [435] J. Morones, J. Elechiguerra, A. Camacho, K. Holt, J. Kouri, J. Ramirez, M. Yacaman, *Nanotechnology*, **2005**, 16, 2346.
- [436] Z.-M. Xiu, J. Ma, P. J. J. Alvarez, *Environ. Sci. Technol.*, **2011**, 45, 9003.
- [437] S. Pal, Y. K. Tak, J. M. Song, *Appl. Environ. Microbiol.*, **2007**, 73, 1712.
- [438] M. Yamanaka, K. Hara, J. Kudo, *Appl. Environ. Microbiol.*, **2005**, 71, 7589.
- [439] P. V. AshaRani, G. Low Kah Mun, M. P. Hande, S. Valiyaveetil, *ACS Nano*, **2008**, 3, 279.
- [440] N. Asare, C. Instanes, W. J. Sandberg, M. Refsnes, P. Schwarze, M. Kruszewski, G. Brunborg, *Toxicology*, **2012**, 291, 65.
- [441] B. Hultberg, A. Andersson, A. Isaksson, *Toxicology*, **1997**, 117, 89.
- [442] C. Greulich, D. Braun, A. Peetsch, J. Diendorf, B. Siebers, M. Epple, M. Köller, *RSC Adv.*, **2012**, 2, 6981.
- [443] R. C. Tilton, B. Rosenberg, *Appl. Environ. Microbiol.*, **1978**, 35, 1116.
- [444] Y. Ando, H. Miyamoto, I. Noda, F. Miyaji, T. Shimazaki, Y. Yonekura, M. Miyazaki, M. Mawatari, T. Hotokebuchi, *Biocontrol Sci.*, **2010**, 15, 15.
- [445] P. W. Atkins, J. de Paula, *Physikalische Chemie*, Wiley-VCH, Weinheim, **2006**.
- [446] C. M. Jackson, M. P. Esnouf, D. J. Winzor, D. L. Duewer, *Accredit. Qual. Assur.*, **2007**, 12, 283.
- [447] O. Toussaint, E. D. Schneider, *Comp. Biochem. Physiol., Part A Mol. Integr. Physiol.*, **1998**, 120, 3.
- [448] Y. Demirel, S. Sandler, *Biophys. Chem.*, **2002**, 97, 87.
- [449] C.-K. Siu, B. S. Fox-Beyer, M. K. Beyer, V. E. Bondybey, *Chem-Eur. J.*, **2006**, 12, 6382.

- [450] J. R. Reinfelder, S. I. Chang, *Environ. Sci. Technol.*, **1999**, 33, 1860.
- [451] M. Grosell, C. Hogstrand, C. Wood, H. Hansen, *Aquat. Toxicol.*, **2000**, 48, 327.
- [452] C. Fortin, P. G. Campbell, *Environ. Toxicol. Chem.*, **2000**, 19, 2769.
- [453] J. Liu, D. Sonshine, S. Shervani, R. Hurt, *ACS Nano*, **2010**, 4, 6903.
- [454] C. Levard, E. M. Hotze, G. V. Lowry, G. E. Brown, *Environ. Sci. Technol.*, **2012**, 46, 6900.
- [455] D.-Y. Lee, C. Fortin, P. G. Campbell, *Aquat. Toxicol.*, **2005**, 75, 127.
- [456] J. Fabrega, S. R. Fawcett, J. C. Renshaw, J. R. Lead, *Environ. Sci. Technol.*, **2009**, 43, 7285.
- [457] J. Zook, S. Long, D. Cleveland, C. Geronimo, R. MacCuspie, *Anal. Bioanal. Chem.*, **2011**, 401, 1993.
- [458] L. Stebounova, E. Guio, V. Grassian, *J. Nanopart. Res.*, **2011**, 13, 233.
- [459] G. S. Forbes, *J. Am. Chem. Soc.*, **1911**, 33, 1937.
- [460] G. S. Forbes, H. I. Cole, *J. Am. Chem. Soc.*, **1921**, 43, 2492.
- [461] C. W. Davies, A. L. Jones, *Discuss. Faraday Soc.*, **1949**, 5, 103.
- [462] C. W. Davies, A. L. Jones, *T. Faraday Soc.*, **1955**, 51, 812.
- [463] J. J. Fritz, *J. Solution Chem.*, **1985**, 14, 865.
- [464] J. E. Shaff, B. A. Schultz, E. J. Craft, R. T. Clark, L. V. Kochian, *Plant Soil*, **2009**, 330, 207.
- [465] J. M. Zook, M. D. Halter, D. Cleveland, S. E. Long, *J. Nanopart. Res.*, **2012**, 14, 1165.
- [466] L. Clem Gruen, *Biochim. Biophys. Acta*, **1975**, 386, 270.
- [467] J. M. Zook, R. I. MacCuspie, L. E. Locascio, M. D. Halter, J. T. Elliott, *Nanotoxicology*, **2011**, 5, 517.
- [468] B. C. Reinsch, C. Levard, Z. Li, R. Ma, A. Wise, K. B. Gregory, G. E. Brown, G. V. Lowry, *Environ. Sci. Technol.*, **2012**, 46, 6992.

- [469] J. Liu, Z. Wang, F. D. Liu, A. B. Kane, R. H. Hurt, *ACS Nano*, **2012**.
- [470] T. Shoeib, K. W. M. Siu, A. C. Hopkinson, *J. Phys. Chem. A*, **2002**, *106*, 6121.
- [471] A. Roos, W. F. Boron, *Physiol. Rev.*, **1981**, *61*, 296.
- [472] E. Carafoli, *Annu. Rev. Biochem.*, **1987**, *56*, 395, PMID: 3304139.
- [473] C.-Y. Fang, V. Vijayanthimala, C.-A. Cheng, S.-H. Yeh, C.-F. Chang, C.-L. Li, H.-C. Chang, *Small*, **2011**, *7*, 3363.
- [474] Z. Chu, Y. Huang, Q. Tao, Q. Li, *Nanoscale*, **2011**, *3*, 3291.
- [475] J. K. Vasir, V. Labhasetwar, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **2007**, *59*, 718.
- [476] I. I. Slowing, J. L. Vivero-Escoto, Y. Zhao, K. Kandel, C. Peeraphatdit, B. G. Trewyn, V. S. Lin, *Small*, **2011**, *7*, 1526.
- [477] C. Xu, D. Miranda-Nieves, J. A. Ankrum, M. E. Matthiesen, J. A. Phillips, I. Roes, G. R. Wojtkiewicz, V. Juneja, J. R. Kultima, W. Zhao, P. K. Vemula, C. P. Lin, M. Nahrendorf, J. M. Karp, *Nano Lett.*, **2012**, *12*, 4131.
- [478] X. Jiang, C. Röcker, M. Hafner, S. Brandholt, R. M. Dörlich, G. U. Nienhaus, *ACS Nano*, **2010**, *4*, 6787.
- [479] H. Jin, D. A. Heller, M. S. Strano, *Nano Lett.*, **2008**, *8*, 1577.
- [480] H. Jin, D. A. Heller, R. Sharma, M. S. Strano, *ACS Nano*, **2009**, *3*, 149.
- [481] B. D. Chithrani, W. C. W. Chan, *Nano Lett.*, **2007**, *7*, 1542.
- [482] I. Mellman, R. Fuchs, A. Helenius, *Annu. Rev. Biochem.*, **1986**, *55*, 663.
- [483] A. B. Parekh, R. Penner, *Physiol. Rev.*, **1997**, *77*, 901.
- [484] S. Ohta, S. Inasawa, Y. Yamaguchi, *Biomaterials*, **2012**, *33*, 4639.
- [485] L. Ng, A. J. Grodzinsky, J. Sandy, A. Plaas, C. Ortiz, *Macromol. Symp.*, **2004**, *214*, 1.
- [486] F. Horkay, P. J. Basser, A.-M. Hecht, E. Geissler, *Macromolecules*, **2012**, *45*, 2882.
- [487] S. Koutsopoulos, *J. Biomed. Mater. Res. A*, **2002**, *62*, 600.

- [488] T. Maruyama, T. Toida, T. Imanari, G. Yu, R. J. Linhardt, *Carbohydr. Res.*, **1998**, *306*, 35.
- [489] R. Servaty, J. Schiller, H. Binder, K. Arnold, *Int. J. Biol. Macromol.*, **2001**, *28*, 121.
- [490] K. Potter, L. H. Kidder, I. W. Levin, E. N. Lewis, R. G. S. Spencer, *Arthritis Rheum.*, **2001**, *44*, 846–855.
- [491] D. He, X. Xiao, F. Liu, R. Liu, *Appl. Surf. Sci.*, **2008**, *255*, 361.
- [492] H. Puchtler, S. N. Meloan, M. S. Terry, *J. Histochem. Cytochem.*, **1969**, *17*, 110.
- [493] C. A. Gregory, W. Grady Gunn, A. Peister, D. J. Prockop, *Anal. Biochem.*, **2004**, *329*, 77.
- [494] A. B. Novikoff, P. M. Novikoff, O. M. Rosen, C. S. Rubin, *J. Cell Biol.*, **1980**, *87*, 180.
- [495] J. L. Ramírez-Zacarías, F. Castro-Muñozledo, W. Kuri-Harcuch, *Histochemistry*, **1992**, *97*, 493.
- [496] Y. S. Choi, S.-N. Park, H. Suh, *Biomaterials*, **2005**, *26*, 5855.
- [497] Y. Sakaguchi, I. Sekiya, K. Yagishita, T. Muneta, *Arthritis Rheum.*, **2005**, *52*, 2521.
- [498] R. K. Jaiswal, N. Jaiswal, S. P. Bruder, G. Mbalaviele, D. R. Marshak, M. F. Pittenger, *J. Biol. Chem.*, **2000**, *275*, 9645.
- [499] D. Terry, R. Chopra, J. Ovenden, T. Anastassiades, *Anal. Biochem.*, **2000**, *285*, 211.
- [500] R. Gonzalez-McQuire, D. W. Green, K. A. Partridge, R. O. C. Oreffo, S. Mann, S. A. Davis, *Adv. Mater.*, **2007**, *19*, 2236.
- [501] L. A. Hails, J. C. Babister, S. Inglis, S. A. Davis, R. O. C. Oreffo, S. Mann, *Small*, **2010**, *6*, 1986.
- [502] J. B. Vines, D.-J. Lim, J. M. Anderson, H.-W. Jun, *Acta Biomater.*, **2012**, *8*, 4053.
- [503] S.-I. Roohani-Esfahani, S. Nouri-Khorasani, Z. Lu, R. Appleyard, H. Zreiqat, *Biomaterials*, **2010**, *31*, 5498.
- [504] W. Schneiders, C. Rentsch, S. Rehberg, S. Rein, H. Zwipp, S. Rammelt, *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.*, **2012**, *32*, 1926.



- [505] J. H. Kim, J.-W. Kim, B. H. Chung, *J. Colloid Interface Sci.*, **2011**, 360, 335.
- [506] A. Bujacz, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, **2012**, 68, 1278.
- [507] P. Artimo, M. Jonnalagedda, K. Arnold, D. Baratin, G. Csardi, E. de Castro, S. Duvaud, V. Flegel, A. Fortier, E. Gasteiger, A. Grosdidier, C. Hernandez, V. Ioannidis, D. Kuznetsov, R. Liechti, S. Moretti, K. Mostaguir, N. Redaschi, G. Rossier, I. Xenarios, H. Stockinger, *Nucleic Acids Res.*, **2012**, 40, W597.
- [508] S. H. Brewer, W. R. Glomm, M. C. Johnson, M. K. Knag, S. Franzen, *Langmuir*, **2005**, 21, 9303.
- [509] F. Arias, L. A. Godínez, S. R. Wilson, A. E. Kaifer, L. Echegoyen, *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, 118, 6086.
- [510] R. Huber, J. Deisenhofer, P. M. Colman, M. Matsushima, W. Palm, *Nature*, **1976**, 264, 415.
- [511] D. R. Davies, S. Chacko, *Acc. Chem. Res.*, **1993**, 26, 421.
- [512] W. G. Lilyestrom, S. J. Shire, T. M. Scherer, *J. Phys. Chem. B*, **2012**, 116, 9611.
- [513] L. J. Harris, E. Skaletsky, A. McPherson, *J. Mol. Biol.*, **1998**, 275, 861.
- [514] W. J. Parak, T. Pellegrino, C. M. Micheel, D. Gerion, S. C. Williams, A. P. Alivisatos, *Nano Lett.*, **2003**, 3, 33.
- [515] N. Borovok, E. Gillon, A. Kotlyar, *Bioconjugate Chem.*, **2012**, 23, 916.



## 7 Anhang

### Physikalische und chemische Referenzdaten<sup>1</sup>

Avogadro-Konstante	$N_A$	$6,02214129 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1}$
Calcium	Molmasse	$40,078 \text{ g mol}^{-1}$
Gold	Molmasse	$196,966569 \text{ g mol}^{-1}$
Gold	Dichte	$19,3200 \text{ g cm}^{-3}$
Kohlenstoff	Molmasse	$12,011 \text{ g mol}^{-1}$
Phosphor	Molmasse	$30,973762 \text{ g mol}^{-1}$
Silber	Molmasse	$107,8682 \text{ g mol}^{-1}$
Wasserstoff	Molmasse	$1,008 \text{ g mol}^{-1}$

<sup>1</sup>NIST Standard Reference Databases, <http://www.nist.gov/index.html>, Stand 21. April 2013

## Liste der verwendeten Chemikalien

Name	Hersteller	CAS-Nr.	Bemerkung
6-Aminofluorescein	Sigma Aldrich	51649-83-3	~ 95 %
7-Aminoactinomycin D	BD Bioscience	7240-37-1	–
Agarose	Life Technologies	9012-36-6	UltraPure™
<i>Alcian Blue</i>	Sigma Aldrich	75881-23-1	–
<i>Alizarin Red S</i>	Sigma Aldrich	130-22-3	–
Ammoniaklösung	Carl Roth	1336-21-6	30 %, p.a.
Calciumnitrat Tetrahydrat	Sigma Aldrich	13477-34-4	≥ 99 %
CellMask Deep Red™	Life Technologies	-	5 mg mL <sup>-1</sup> in DMSO
Coomassie Brilliantblau	Merck	6104-58-1	–
D-(+)-Trehalose-Dihydrat	Sigma Aldrich	6138-23-4	≥ 99 %
DAPI Dilactat	Life Technologies	–	–
Diammonium-hydrogenphosphat	Sigma Aldrich	7783-28-0	≥ 98 %
DMSO	Applichem	67-68-5	≥ 99,5 %
EDC Hydrochlorid	Sigma Aldrich	25952-53-8	
Ethanol	VWR	64-17-5	99,8 %
FCS	Life Technologies	–	–
Formaldehyd	Merck Millipore	50-00-0	37 %
Gerbsäure	Acros Organics	1401-55-4	95 %
Gold		7440-57-5	99,99 %
HEPES	Sigma Aldrich	7365-45-9	–
HOBt Hydrat	FLUKA	123333-53-9	≥ 99 %
Hoechst 33342	Life Technologies	–	–
IgG, polyklonal (humanes Serum)	antibodies online		>95%
LB Broth-Medium	Sigma Aldrich	–	Pulver
( <i>RS</i> )-Liponsäure	Sigma Aldrich	1077-28-7	≥ 98 %
<i>Lyso Tracker® Red DND-99</i>	Life Technologies	–	–
Mercaptoethylamin HCl	Sigma Aldrich	156-57-0	≥ 98 %
Natriumborhydrid	FLUKA	16940-66-2	≥ 96 %
Na-Carboxymethylcellulose	Sigma Aldrich	9004-32-4	$M_w = 9 \cdot 10^4$ g mol <sup>-1</sup> , SD=0,7

## Liste der verwendeten Chemikalien (Fortsetzung)

Name	Hersteller	CAS-Nr.	Bemerkung
Na-Chondroitin-4-sulfat	Sigma Aldrich	39455-18-0	<i>bovine trachea</i>
N-Hydroxysuccinimid	Sigma Aldrich	6066-82-6	98 %
Morpholinoethansulfonsäure	Sigma Aldrich	4432-31-9	≥ 99 %
Polyvinylpyrrolidon	FLUKA	9003-39-8	$M_w = 4 \cdot 10^4 \text{ g mol}^{-1}$
Rinderserumalbumin	SERVA	9048-46-8	gefriergetrocknet
RPMI	Life Technologies	–	–
Salpetersäure	J. T. Baker		65 %, p.a.
Silbernitrat	Carl Roth	7761-88-8	≥ 99,9 %
TAE-Puffer-Lösung	Genaxxon	–	10×, pH=8,5
Trinatriumcitrat Dihydrat	FLUKA	6132-04-3	≥ 99 %
Trypsin-EDTA	Sigma Aldrich	–	–

## Liste der verwendeten Organismen

Name	Hersteller / Ursprung	Bemerkung
Humane mesenchymale Stammzellen	Lonza	3. bis 8. Passage
Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes	freiwillige Spender	–
MG-63	ATCC	35. Passage
<i>Staphylococcus aureus</i>	DSMZ 1104	–
<i>Escherichia coli</i>	Life Technologies, DSMZ 6897	DH5α

## Liste der verwendeten Geräte

Bezeichnung	Hersteller	Bemerkung
CLSM	Leica	SP5
CLSM	Zeiss	LSM 700
Durchflusszytometer	Becton Dickinson	FACSCalibur <sup>TM</sup>
Durchlichtmikroskop	PEQLAB	Evos xl core
Dynamische Lichtstreuung	Malvern Instruments	Zetasizer Nano ZS
Energiedispersive Röntgenspektroskopie	EDAX	Genesis 4000
Fluoreszenzmikroskop MVX10	Olympus	–
Fluoreszenzspektrometer	J&M Analytik	J&M TIDAS
FTIR-Spektrometer	Bruker	Vertex 70
Kleinwinkel-Röntgenbeugung	PanAnalytical	Empyrean
Micro-Plate Reader	Dynex Technologies	MRX Revelation
Pulverdiffraktometer	Bruker	D8 Advance
Rasterelektronenmikroskop	FEI	Quanta 400 FEG
Transmissionselektronenmikroskop	Philips	CM 200 FEG
Thermowaage	Netzsch	TG 449 F3 Jupiter <sup>©</sup>
Ultrazentrifuge	Thermo Scientific	SORVALL WX Ultra Series, Type 70 Ti Rotor, Beckman Coulter
Ultraschalldispenser UP50H	Hielscher	Sonotrode 2, Amplitude 50 %, Puls 0,8
UV/Vis-Spektrometer	Varian	Cary Bio 300
UV/Vis-Spektrometer	GE Healthcare	Ultrospec 3100 pro

# Lebenslauf

Der Lebenslauf ist aus datenschutzrechtlichen Gründen in der digitalen Version nicht einzusehen.





## Publikationsliste

- A. Peetsch, C. Greulich, D. Braun, C. Stroetges, H. Rehage, B. Siebers, M. Köller, and M. Epple. Silver-doped calcium phosphate nanoparticles: Synthesis, characterization, and toxic effects towards mammalian and prokaryotic cells. *Colloids and Surfaces, B: Biointerfaces*, **2013**, *102*, 724-729.
- C. Greulich, D. Braun, A. Peetsch, J. Diendorf, B. Siebers, M. Köller, und M. Epple. The toxic effect of silver ions and silver nanoparticles towards bacteria and human cells occurs in the same concentration range, *RSC Advances*, **2012**, *2*, 6981-6987.
- A. Peetsch, C. Greulich, D. Braun, C. Stroetges, H. Rehage, B. Siebers, M. Köller und M. Epple. Silver ion-doped calcium phosphate nanoparticles for antibacterial application. Workshop "Biocompatible Coatings and their applications", Essen, Deutschland, **2012**.
- C. Greulich, J. Diendorf, D. Braun, A. Peetsch, B. Siebers, T.A. Schildhauer, M. Epple und M. Köller. Comparable effect of ionic and nanoparticulate silver on human tissue cells and microorganisms, Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Biomaterialien (DGBM), Hamburg, **2012**.
- M. Surmeneva, R. Surmenev, A. Ivanova, V. Pichugin, A. Sharonova, I. Grubova, M. Chaikina, A. Kovtun, A. Peetsch, O. Prymak und M. Epple. The physicochemical properties of silicate- or silver-containing hydroxyapatite coatings on the surface of medical implants, 4th German-Ukrainian Symposium on Physics and Chemistry of Nanostructures and on Nanobiotechnology, Ilmenau Deutschland, **2012**.
- A. Peetsch, C. Greulich, D. Braun, J. Diendorf, B. Siebers, M. Köller und M. Epple, Comparative study of the influence of silver ions and silver nanoparticles on mammalian and prokaryotic cells in vitro, 9th World Biomaterials Congress (WBC), Chengdu, China, **2012**.
- A. Peetsch, D. Braun, C. Greulich, B. Siebers, M. Köller und M. Epple. Silberdotierte Calciumphosphat-Nanopartikel für antibakterielle Anwendungen, *Biomaterialien*, **2011**, *12*, 8.

- A. Peetsch und M. Epple. Characterization of the solid components of three desensitizing toothpastes and a mouth wash, *Materialwissenschaft und Werkstofftechnik*, **2011**, 42, 131-135.
- A. Peetsch, C. Greulich, D. Braun, B. Siebers, M. Köller und M. Epple. Silberdotierte Calciumphosphat-Nanopartikel für antibakterielle Anwendungen. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Biomaterialien (DGBM), Gießen, Deutschland, **2011**.
- A. Peetsch, C. Greulich, M. Köller, D. Braun, B. Siebers und M. Epple. Silver ion-doped calcium phosphate nanoparticles for antibacterial application, European Society for Biomaterials (ESB) Annual Conference, Dublin, Irland, **2011**.
- D. Kozlova, A. Peetsch und M. Epple. Synthesis, chemical structure and characterization in liquid medium of silver-doped calcium phosphate nanoparticles, 5th Late Summer Workshop on Nanoparticles and Nanomaterials in Aquatic Systems, Maurach, Österreich, **2010**.
- A. Peetsch und M. Epple. Comparison of the nanoscopic solid components of three desensitizing toothpastes and a mouth wash, Ukrainian-German Symposium on Physics and Chemistry of Nanostructures and on Nanobiotechnology, Beregove, Ukraine, **2010**.
- D. Kozlova, A. Peetsch und M. Epple. Synthesis and characterization of silver-doped calcium phosphate nanoparticles, Ukrainian-German Symposium on Physics and Chemistry of Nanostructures and on Nanobiotechnology, Beregove, Ukraine, **2010**.

# Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, die vorliegende Arbeit mit dem Titel

**„Synthese und Funktionalisierung anorganischer Nanopartikel zur Wechselwirkung mit Bakterien und Zellen“**

selbst verfasst und keine außer den angegebenen Hilfsmitteln und Quellen verwendet zu haben.

Zudem erkläre ich, dass ich die Arbeit in dieser oder einer ähnlichen Form bei keiner anderen Fakultät eingereicht und bisher an keinem Promotionsverfahren teilgenommen habe.

Essen, 21. April 2013



# Danksagung

Ich danke...

Herrn Prof. Dr. rer. nat. Matthias Epple für die Bereitstellung des interessanten interdisziplinären Forschungsthemas, für die sehr gute Betreuung während der Arbeit, die gewährten Freiräume bei der Bearbeitung und die Ermöglichung vieler Forschungsaufenthalte und Vorträge auf zahlreichen Fachtagungen im In- und Ausland,

Frau Prof. Dr. rer. nat. Bettina Siebers für die Begutachtung der Dissertation als Zweitgutachterin,

Herrn Prof. Dr. rer. nat. Manfred Köller und Frau Dr. Christina Greulich für die Durchführung der zell- und mikrobiologischen Experimente und die tolle Zusammenarbeit,

Herrn Dieter Braun für die Durchführung der mikrobiologischen Experimente,

Herrn Dr. Meyer-Zaika für die Anfertigung von TEM-Aufnahmen und die vielen kritischen Diskussionen,

Herrn Smail Boukercha und Frau Ursula Giebel für die Hilfe bei vielen REM-Aufnahmen,

Herrn Dr. Oleg Prymak und Herrn Jürgen Gündel-Graber für die Hilfe bei den XRD- und SAXS-Messungen und die vielen kritischen Diskussionen,

Frau Julia Kort für die Unterstützung bei der Gelelektrophorese,

Herrn Simon Pöpsel für die Durchführung der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie,

Frau Kerstin Brauner und Frau Veronika Hiltenkamp für die Durchführung elementaranalytischer Messungen,

Frau Carola Fischer für die Hilfe bei technischen Fragestellungen, Sonderanfertigungen von Geräten und die Unterstützung bei der EDV,

Frau Sabine Kiefer für die stetige Hilfe bei der Bewältigung von An- und Aufträgen,

und Herrn Dr. Dirk Mahl, Herrn Dr. Jan Klesing, Herrn Johannes Rüsing, Herrn Joachim Enax, Frau Olga Rotan, Herrn Simon Ristig, Frau Kateryna Loza, Frau Katrin Wallat, Herrn Dr. Sven Range, Frau Diana Kozlova, Herrn Alexander Rostek, Herrn Sven Backhaus, Herrn Dr. Jörg Diendorf, Herrn Jens Helminger, Herrn Bernhard Neuhaus, Herrn Gregor Dördelmann, Frau Janina Petrack, Herrn Dr. Roman Surmenev, Frau Dr. Surmeneva, Frau Dr. Anna Kovtun, Frau Svitlana Chernousova und Frau Maren Wenzel für die vielen spannenden und lustigen Tage, die Kameradschaft und Hilfe im Labor und die vielen gemeinsamen Reisen.

Zuletzt möchte ich meiner Familie für die Unterstützung, die Geduld und das Verständnis während dieser drei, mit mir doch sehr anstrengenden, Jahre danken.